

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



Bc. Alexandra Polonyiová

Vliv inkubační teploty na kognitivní schopnosti a buněčné složení mozku u gekonů druhu
Paroedura picta

The effect of incubation temperature on cognition and brain cellular composition in geckos
Paroedura picta

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Pavel Němec, Ph.D.

Praha, 2020

Poděkování: Chtěla bych poděkovat především mým školitelům, Mgr. Pavlovi Němcovi, Ph.D. a Mgr. Kristině Kverkové, za obrovskou pomoc a cenné rady nejen při sepsování této diplomové práce, ale v celém průběhu studia, a že mi umožnili věnovat se tak zajímavým věcem.

Mgr. Kristině Kverkové bych chtěla dále poděkovat za vedení experimentu, pomoc se zpracováním dat a neuvěřitelnou trpělivost, kterou se mnou celou dobu měla. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Lucii Marhounové za pomoc při testování a chovu gekonů. V neposlední řadě děkuji i rodině a kamarádům, kteří mě podporovali.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.08.2020

Podpis:

ABSTRAKT

Vliv inkubační teploty na různé morfologické, fyziologické, kognitivní a behaviorální vlastnosti u plazů je velmi studované téma, ačkoli přesný mechanismus vzniku rozdílů mezi jedinci inkubovanými v různých teplotách je jen málo objasněný. V předložené práci se věnuji vlivu inkubační teploty na kognitivní schopnosti a počet neuronů a nonneurálních buněk u gekonů druhu *Paroedura picta*, inkubovaných ve dvou různých inkubačních teplotách, 24°C a 30°C. Gekoni byli testováni ve dvou kognitivních úlohách simulujících útok predátora. Mláďata ve věku 14 dní byla testována v bludišti tvaru Y, půlroční gekoni byli testováni v aréně s barevně odlišenými úkryty. Po otestování byl u některých jedinců v několika částech mozku stanoven počet neuronů a nonneurálních buněk metodou izotropní frakcionace. Ačkoli inkubační teplota nekorelovala s úspěšností v kognitivních úlohách, ovlivnila celkový čas potřebný k nalezení úkrytu. Tento rozdíl byl patrný u mláďat i dospělých gekonů. Počet neuronů, který byl použit jako ukazatel procesní kapacity mozku, s úspěšností v úlohách nekoreloval. S počtem správných odpovědí u dospělců však korelovala absolutní velikost mozku. Inkubační teplota zřejmě ovlivnila především „personalitu“ gekonů, což vedlo k odlišnému chování v kognitivních úlohách.

Klíčová slova: Inkubační teplota, gekoni, kognitivní schopnosti, *Paroedura picta*, počet neuronů, velikost mozku.

ABSTRACT

The effect of incubation temperature on different morphological, physiological, cognitive and behavioral characteristics in reptiles is a well-studied topic, although the underlying mechanism leading to the differences between individuals incubated at different temperatures remains largely unknown. In this thesis I studied the effect of incubation temperature on cognitive abilities and the number of neurons and non-neuronal cells in the gecko *Paroedura picta* incubated at two different temperatures, 24°C and 30°C. The geckos were tested in two cognitive tasks with simulated predatory attack. 14-day-old hatchlings were tested in a Y-maze, while 6-months-old geckos were tested in an arena with shelters of different colors. After testing, the number of neurons and non-neuronal cells in several parts of the brain were estimated using the isotropic fractionator in selected individuals. Although incubation temperature did not affect the success in the cognitive task in hatchlings, it did affect the total time needed to find the shelter. This difference remained significant also in adult geckos. The number of neurons, which was used as a proxy for the information processing capacity of the brain, did not affect success in the cognitive tasks. However, absolute brain size correlated with success in the cognitive task in adults. The incubation temperature likely affected the „personality“ of geckos, which led to different behaviors during the cognitive tasks.

Key words: Incubation temperature, geckos, cognitive abilities, *Paroedura picta*, number of neurons, brain size.

OBSAH

1. Úvod	6
1.1. Inkubační teplota	6
1.1.2. Vliv inkubační teploty na vývoj mozku	8
1.1.3. Vliv inkubační teploty na chování a kognitivní schopnosti	9
1.1.4. Komplexnější manipulace s inkubační teplotou	11
1.2. Kognitivní schopnosti	14
2. Cíle práce	16
3. Metodika	17
3.1. Inkubace	17
3.2. První kognitivní úloha - test učení v Y bludišti	17
3.3. Druhá kognitivní úloha - test učení v aréně	19
3.4. Odhad počtu neuronů	20
3.5. Analýza výsledků	23
4. Výsledky	24
4.1. Vliv inkubační teploty na mláďata	24
4.2. Vliv inkubační teploty na dospělé gekony	28
5. Diskuze	35
5.1. Inkubace a morfologie	35
5.2. Kognitivní úlohy	36
5.3. Velikost mozku a počet neuronů	41
6. Souhrn	46
7. Použitá literatura	47

1. ÚVOD

Inkubační teplota je jedním ze zásadních abiotických faktorů ovlivňující vývoj embrya. Může mít vliv na rozmanité vlastnosti vylíhnutých mláďat, z nichž některé mohou být i trvalého charakteru. Nejedná se pouze o vliv na pohlaví u některých druhů, ale kupříkladu i na morfologii či chování, a to i u plazů, kteří mají geneticky určené pohlaví. Mechanismy zodpovědné za rozdíly mezi jedinci inkubovanými v různých teplotách jsou jen málo prostudovány. Ačkoli byla vlivu inkubační teploty na kognitivní schopnosti věnována značná pozornost (viz níže), většinou byla studována pouze u mláďat, a tak nelze vyloučit možnost, že pozorované rozdíly nepřetrvávají do dospělosti.

V této práci se věnuji vlivu inkubační teploty na kognitivní schopnosti u gekona druhu *Paroedura picta*, který je využíván jako plazí model například pro studium pohlavních steroidních hormonů a sexuálního dimorfismu (Golinski et al., 2014; Kubička et al., 2015; Starostová et al., 2013), ontogeneze (Noro et al., 2009; Zahradnicek et al., 2012), růstu (Meter et al., 2020; Starostová et al., 2017), reprodukce (Kubička et al., 2012; Weiser et al., 2012) či chování (Blumberg et al., 2002; Brillet, 1993). Tento druh je vhodným modelovým organismem pro studium vlivu inkubační teploty díky jeho snadnému chovu, genetickému určení pohlaví a krátkým intervalům mezi jednotlivými snůškami.

Aby bylo možné posoudit, zda vliv inkubační teploty je trvalý, testování kognitivních schopností bylo prováděno jak u mláďat, tak v dospělosti. Jedním z hlavních faktorů ovlivňujících kognitivní schopnosti je počet neuronů (Herculano-Houzel 2017, Němec & Osten 2020), který lze stanovit pomocí metody izotropní frakcionace (Herculano-Houzel & Lent, 2005). Počet neuronů byl stanoven u některých mláďat a dospělých gekonů, kteří byli testováni v kognitivních úlohách, aby bylo možné posoudit, zda (i) inkubační teplota ovlivňuje počet neuronů a (ii) počet neuronů souvisí s úspěšností v kognitivních úlohách.

1.1. Inkubační teplota u plazů

U většiny oviparních plazů samice po snesení vajec o snůšku nepečuje a plazí embryo je po dobu inkubace vystavováno různým okolním vlivům, které mají vliv na vývoj zárodku. Jedním z nich je i inkubační teplota, která může ovlivnit mnoho vlastností, ať už morfologických, fyziologických, behaviorálních nebo kognitivních, přičemž mnohé z nich mohou být pro přežití mláďate zcela zásadní. Inkubační teplotu většinou může samice ovlivnit pouze výběrem místa pro snesení vajec o vhodné teplotě a vlhkosti. Každý druh má určitý rozsah teplot, ve kterých

se může embryo úspěšně vyvíjet, závisící na přirozeném prostředí daného druhu, a optimální teplotu, která je pro vývoj embrya nejvhodnější. Přílišný odklon od optimálních teplot je pro zárodek letální. Jedinci inkubovaní v teplotách, které se blíží k hraničním hodnotám pro úspěšný vývoj, se mohou výrazně lišit od jedinců inkubovaných v optimální teplotě (např. Eiby & Booth, 2011; While et al., 2018)

Nejprostudovanější je zřejmě vliv inkubační teploty na pohlaví jedince u druhů, které mají teplotně určené pohlaví. U těchto druhů inkubační teplota ovlivňuje během termosenzitivní periody vývoj gonád a v některých teplotách jsou všechna mláďata či jejich převážná většina samčího pohlaví a v některých naopak samičího pohlaví. Teplota má zřejmě vliv na produkci a regulaci hormonů a enzymů s nimi spjatých, které ovlivňují, který typ gonád se vyvine. Například aromatáza přeměňuje androgeny na estrogeny (Pieau et al., 1999). Ve studiích, které se věnují vlivu inkubační teploty na jiné vlastnosti než pohlaví, není druh s teplotně určeným pohlavím vhodný jako modelový organismus, jelikož je poté komplikovanější oddělit vliv teploty a vliv pohlaví.

Nejvíce prací bylo věnováno vlivu inkubační teploty na morfologické znaky, jako je délka inkubace, velikost či růst mláďate. Nižší teplota obvykle znamená delší inkubaci (viz např. Burger, 1990; Nelson et al., 2004). U některých druhů může rozdíl několika stupňů znamenat až dvojnásobně delší inkubaci – například u scinků *Eumeces elegans* průměrná doba inkubace u jedinců inkubovaných v 33 °C byla 20 dní, u jedinců inkubovaných ve 24 °C byla 44 dní (Du et al., 2003). U hatérie novozélandské (*Sphenodon punctatus*) rozdíl čtyř stupňů prodloužil délku inkubace o 60 %, mláďata inkubovaná v 22 °C se líhla průměrně po 165 dnech, zatímco mláďata inkubovaná v 18 °C až po 264 dnech (Nelson et al., 2004). Rozdílná inkubační teplota většinou neměla vliv na úspěšnost líhnutí, může se ale lišit množství žloutku vstřebaného během doby inkubace (Booth et al., 2004).

V mnoha případech ovlivňuje inkubační teplota hmotnost a délku těla, většinou ve prospěch jedinců inkubovaných ve vyšších teplotách, jako například u scinků *Bassiana duperreyi* (Amiel et al., 2014). U některých druhů inkubační teplota neměla vliv na hmotnost, například u štíhlovky americké (*Coluber constrictor*) a korálovky pruhaté (*Lampropeltis getula*), ale ovlivnila délku těla, opět ve prospěch jedinců z vyšších teplot (Burger, 1990). Ani u scinků druhu *Eumeces elegans* neměla inkubační teplota vliv na hmotnost, ale jedinci inkubovaní v nižší teplotě měli větší délku těla (Du et al., 2003). Rozdílný vliv na hmotnost a délku těla může mít inkubační teplota i u druhů, které žijí sympatricky v podobných podmínkách. U scinků druhů *Lampropholis delicata*, *Nannoscincus maccoyi* a *Saproscincus mustelina* měla mláďata

inkubovaná v chladnějších teplotách vyšší hmotnost těla, ale délka těla se lišila mezi jednotlivými druhy. Zatímco u druhů *L. delicata* a *S. mustelina* byla mláďata z vyšší teploty delší, u druhu *N. maccoyi* tomu bylo naopak. U těchto dvou zmíněných druhů měla mláďata z vyšší inkubační teploty větší délku těla, ale menší hmotnost, než mláďata z nižší teploty, tudíž musela mít gracilnější postavu (Downes et al., 1999). Rozdílné výsledky u různých druhů mohou poukazovat na to, že druhy jsou různě citlivé na změnu inkubační teploty, případně že u nich inkubační teplota ovlivňuje různé vlastnosti.

Rozdíly mohou být i na buněčné a molekulární úrovni. U kožnatky čínské (*Pelodiscus sinensis*) měla embrya ve vyšších inkubačních teplotách zvýšenou mitochondriální respiraci a aktivitu cytochrom c oxidázy (COX) (Sun et al., 2015). Genová exprese se lišila například u ještěrky zední (*Podarcis muralis*). Embrya vystavená nižším teplotám produkovala až o 20 % méně RNA a většina změn se týkala stavby chromatinu a regulace transkripce a translace, což by možná mohlo souviset s procesy adaptace na chladnější teplotu (Feiner et al., 2018). V jiném experimentu se stejným druhem nižší inkubační teplota způsobila hypomethylaci DNA v mozkové tkáni, což má vliv na genovou expresi a stabilitu genomu. Jedinci z nižší teploty měli také vyšší úmrtnost, což by mohlo souviset právě s nižší stabilitou genomu (Paredes et al., 2016). U gekončíka nočního (*Eublepharis macularius*) se jedinci z různých teplot lišili v expresi genů souvisejících nejenom s určením pohlaví, ale i s neurální diferenciací či metabolickými drahami (Pallotta et al., 2017).

1.1.1 Vliv inkubační teploty na vývoj mozku

Několik studií se věnovalo vlivu inkubační teploty na mozek. Velká část vývoje mozku probíhá během embryogeneze a možné rozdíly ve stavbě mozku by mohly vysvětlovat i odlišné chování a učení mezi jedinci z různých teplot. V experimentu se scinky druhu *Bassiana duperreyi* měla mláďata inkubovaná v chladnější teplotě větší telencephalon, a to jak absolutně, tak relativně k velikosti jejich těla, zároveň měla i větší jádra buněk a nižší hustotu neuronů v mediálním kortexu, který hraje důležitou roli v prostorové orientaci (Amiel et al., 2017). U gekončíka nočního (*Eublepharis macularius*) ovlivnila inkubační teplota velikost a metabolickou kapacitu (odhadnutou kvantifikací exprese cytochrom c oxidázy) některých částí mozku, zejména měla vliv na velikost preoptické oblasti a ventromediálního jádra hypothalamu (Coomber et al., 1997). Metabolickou kapacitu různých částí ovlivnila nejenom inkubační teplota, ale i pohlaví jedince. Odlišení vlivu inkubační teploty a pohlaví na metabolickou kapacitu a velikost

některých částí mozku bylo obtížné i vzhledem k tomu, že tento druh má teplotně určené pohlaví (Coomber et al., 1997; Sakata, 2000).

1.1.2. Vliv inkubační teploty na chování a kognitivní schopnosti

Pozornost byla často věnována rychlosti pohybu, která se většinou testovala tak, že jedinec byl umístěn do arény či tunelu a měřil se čas potřebný k přemístění na druhý konec. Pohyb zvířete byl zajištěn tzv. simulovaným útokem predátora, při kterém se experimentátor zvířete dotýkal nějakým předmětem na zádech či ocase (viz např. Dayananda et al., 2017; Burger, 1990). Ve většině případů byli rychlejší jedinci z vyšší teploty, např. u scinků druhů *Bassiana duperreyi* (Elphick & Shine, 2006) *Lampropholis delicata* a *Saproscincus mustelina* (Downes et al., 1999) nebo karety obrovské (*Chelonia mydas*) (Booth et al., 2004). Ovšem při příliš vysoké teplotě může být motorika zcela narušena, jako tomu bylo u scinků druhu *Eumeces elegans* inkubovaných v 33 °C (Du et al., 2003). Aktivita v tzv. open-field testu byla zkoumána u gekončků druhu *Coleonyx elegans*. Při tomto testu jsou gekoni umístěni do arény, jejíž plocha je rozdělena na čtverce, a sleduje se, kolik čtverců za vyměřený čas gekon navštíví a jak často se drží u stěn arény či se naopak pohybuje v otevřeném prostoru. Jedinci inkubovaní v 30 °C byli méně aktivní než jedinci inkubovaní v 26 a 28 °C (Trník et al., 2016).

Inkubační teplota může ovlivnit i chování související se získáváním potravy. U agamy vousaté (*Pogona vitticeps*) se jedinci z různých teplot lišili ve schopnosti získávat potravu. Jedinci inkubovaní ve vyšších teplotách rychleji našli a ulovili cvrčka v aréně (Siviter et al., 2019). Schopnost lovit byla testována i u chameleonů druhu *Chamaeleo calyptatus* ze dvou různých inkubačních teplot, ovšem při tomto experimentu jedinci z chladnější teploty lovili rychleji a při lovení se méně pohybovali, což mohlo ovlivnit i to, že měli delší jazyky než jedinci z vyšší teploty (Ballen et al., 2015). Naopak u gekončků druhu *Coleonyx elegans* se jedinci z různých inkubačních teplot nelišili v rychlosti a efektivitě lovení cvrčků (Trník et al., 2016). Schopnost detekovat potenciální kořist byla ovlivněna inkubační teplotou u užovek býčích (*Pituophis melanoleucus*) v experimentu, ve kterém byly na konci jednoho ramena bludiště tvaru Y umístěny hoblíny s pachem myší. Toto rameno si častěji vybíraly užovky z vyšší inkubační teploty (Burger, 1991).

U některých druhů byl pozorován rozdíl i v antipredačním chování. Jedinci štíhlavky americké (*Coluber constrictor*) inkubovaní ve vyšší teplotě byli úspěšnější proti potenciálnímu predátorovi, což zahrnovalo např. počet útoků či výšku hlavy při útoku proti examinátorovi, který jedince podnítil k útočnému chování pohybem prstu v blízkosti hada (Burger, 1990). U

scinků druhů *Lampropholis delicata*, *Saproscincus mustelina* a *Nannoscincus maccoyi* se jedinci lišili i ve schopnosti detekovat přirozeného predátora podle pachové stopy. U prvních dvou zmíněných druhů reagovali lépe jedinci z nižší teploty (Downes et al., 1999). Mláďata užovky býčí (*Pituophis melanoleucus*) z prostřední inkubační teploty (27-28 °C) potřebovala méně času k nalezení úkrytu při vystavení vizuálnímu stimulu představujícímu predátora, než mláďata z nižší a vyšší teploty (22-23 °C a 32-33 °C) (Burger, 1998).

Chování spojené s rozmnožováním bylo studováno například u gekončíka nočního (*Eublepharis macularius*), který má teplotně určené pohlaví. Samci z vyšších teplot, ve kterých se více líhnou samci, byli více agresivní a méně sexuálně aktivní než samci z nižších teplot, ve kterých se více líhnou samice. Navíc se lišili i v teritoriálním chování, po zkušenosti se samicemi se samci z nižší teploty chovali více teritoriálně, což bylo vyhodnoceno podle reakce na pachové stopy, vibrování ocasem a značkování arény, zatímco samci z vyšší teploty se i po kontaktu se samicí chovali stejně jako samci naivní (Sakata & Crews, 2003). Samci tohoto druhu z inkubační teploty, ve které se více líhnou samice, mají také vyšší hladinu dopaminu, což by mohlo souviset s rozdíly v sexuálním a sociálním chování (Dias et al., 2007). U samců agamy druhu *Amphibolurus muricatus* inkubační teplota sice neovlivnila imponující chování, ale ovlivnila reprodukční úspěšnost. Samci z prostředních teplot měli více úspěšných kopulací a potomků. Důvod je nejistý, jako možná vysvětlení se nabízí kvalita spermií nebo atraktivita samců (Warner et al., 2010).

Rozdílných výsledků dosahovali jedinci z různých inkubačních teplot i při experimentech zaměřených na učení. Scinkové druhu *Bassiana duperreyi* inkubovaní ve vyšší teplotě byli úspěšnější při úloze zaměřené na prostorovou orientaci, při které se měli naučit pozici otevřeného úkrytu v Y bludišti. Jedinci z obou skupin se sice v učení během experimentu zlepšovali, ale ve skupině z vyšší teploty se zlepšovali rychleji (Amiel et al., 2014). Schopnost naučit se pozici správného úkrytu se lišila i u gekonů druhu *Amalosia lesueurii*, jedinci z optimální teploty byli úspěšnější než jedinci z teploty zvýšené (Abayarathna & Webb, 2020; Dayananda et al., 2017).

Při některých úlohách nemusí být rozdíl pouze v rychlosti učení, ale může dokonce ovlivnit přímo to, zda se jedinec danou úlohu dokáže naučit, jak ukazuje pokus se scinky druhu *Bassiana duperreyi* zaměřený na operantní podmiňování a asociační učení (Clark et al., 2014). Mláďata se v první fázi experimentu měla naučit manipulovat s víčkem, které zakrývalo nádobu s odměnou ve formě cvrčka, čemuž předcházela tréninková část, při které mělo mládě najít a ulovit cvrčka v odkryté nádobě. V druhé fázi měly nádoby různě barevná víčka, ale pouze pod

víčkem o jedné určité barvě se nacházela odměna a pozice správné nádoby se neměnila. Ve třetí fázi se pozice nádoby s odměnou měnila mezi jednotlivými pokusy, nicméně barva zůstávala stále stejná a mládě si mělo asociovat barvu s odměnou. Poslední fáze byla zaměřená na reverzní učení, změnila se tedy barva víčka, pod nímž byla odměna. Jedinec, který v některé části nesplnil kritérium, nebyl zahrnut do dalších fází experimentu. Scinkové z chladnější teploty dokázali obstát pouze v tréninkové fázi, nicméně žádný z nich se nebyl schopen naučit ani první fázi, zatímco polovina jedinců z vyšší teploty se naučila první fázi, 93 % z nich splnilo druhou fázi, všichni zbývající se dokázali naučit část třetí a 62 % z nich obstálo i v reverzním učení.

Vliv na sociální učení byl studován u agamy vousaté (*Pogona vitticeps*). Inkubační teplota sice neovlivnila schopnost pozorovat pohled jiného jedince, ale ovlivnila samotné sociální učení. Agamy se měly naučit otevírat dvířka, přičemž jim bylo umožněno pozorovat jiného jedince, jak tento úkol plní. Úkol dokázali splnit jedinci z obou skupin, ale agamy z chladnější teploty potřebovaly k otevření dvířek méně času (Siviter et al., 2017a).

Úspěšnost v kognitivních úlohách by mohla také ovlivnit personalita, která je definována jako stabilní a dlouhodobé behaviorální, emoční i fyziologické rozdíly v různých charakteristikách jedinců stejného druhu (Carere & Locurto, 2011). Při pokusu, který zjišťoval, zda inkubační teplota může ovlivnit i samotnou personalitu, byla agama vousatá (*Pogona vitticeps*) vystavována novým objektům za účelem testovat jednu z kategorií personality, „boldness/shyness“, která hodnotí, jak je jedinec ochoten riskovat v nové situaci. Jedinci byli umístěni do arény, kde se nacházel nový objekt, se kterým se zvíře ještě nikdy nesetkalo, a měřila se doba, kterou stráví v jeho blízkosti. Stejný postup se opakoval po 5 měsících, ovšem s jiným objektem. Jedinci z různé inkubační teploty se mezi sebou lišili, agamy inkubované ve vyšší teplotě strávily v blízkosti nového objektu více času, ovšem po 5 měsících byly výsledky opačné, což ukazuje na to, že nejspíše nepůjde o personalitu, protože rozdíly nejsou dlouhodobé. To ovšem nevylučuje možnost, že inkubační teplota v tomto experimentu ovlivnila chování a jeho vývoj (Siviter et al., 2017b). Podobné rozdíly mohou snadno ovlivnit výsledky v kognitivních úlohách, pokud se jedná například o úlohu, kde se musí zvíře aktivně pohybovat v novém prostředí.

1.1.3. Komplexnější manipulace s inkubační teplotou

Nelze obecně říci, zda mláďata z vyšší nebo nižší teploty budou větší, rychlejší či úspěšnější v kognitivních úlohách. Ve většině experimentů dosahovali lepších výsledků jedinci inkubovaní ve vyšší teplotě (např. Amiel & Shine, 2012; Amiel et al., 2014; Elphick & Shine, 2006), není to

však pravidlem, a v některých studiích tomu bylo opačně (např. Brown & Shine, 2006; Siviter et al., 2017a).

Ovšem je nutné přihlédnout k teplotám, které autoři ve svých studiích zvolili, zejména k tomu, jak jsou inkubační teploty v experimentu vzdáleny optimální teplotě pro daný druh. V některých studiích autoři porovnávají rozdíly mezi současnou inkubační teplotou pro daný druh ve volné přírodě a teplotou, která podle odhadů bude ve stejném prostředí v budoucnosti, tudíž „současná teplota“ je v těchto experimentech ta nižší.

Tímto způsobem byl například porovnán růst, rychlost pohybu a přežívání u gekonů druhu *Amalosia lesueurii* (Dayananda et al., 2017). Gekoni inkubovaní v chladnější teplotě odpovídající současné teplotě v jejich přirozeném prostředí, byli větší, rychlejší a lépe přežívali. V jiných experimentech se stejným druhem gekona, se gekoni z nižší teploty, opět reprezentující současné podmínky, i rychleji učili najít správný úkryt v bludišti tvaru Y (Abayarathna & Webb, 2020). V další studii dokonce jedinci z nižší inkubační teploty, kteří se lépe a rychleji učili v úloze zaměřené na prostorovou orientaci, lépe přežívali po vypuštění do přirozeného prostředí (Dayananda & Webb, 2017). Cílem těchto studií bylo zejména zjistit, jakým způsobem mohou být oviparní plazi ovlivněni oteplením klimatu a s ním souvisejícím nárůstem inkubační teploty.

Tyto studie potom samozřejmě přinesou rozdílné výsledky než ty, ve kterých jak vyšší, tak nižší teplota představují určité odklonění od optimální teploty, které je důležitější než absolutní hodnota. Například v experimentu se scinky druhu *Plestiodon chinensis* byla vajíčka inkubována v 5 různých teplotách, 24, 26, 28, 30 a 32 °C, přičemž optimální teplota je 26-30 °C. Jedinci inkubovaní ve středních teplotách (26, 28 a 30 °C) měli vyšší hmotnost i délku těla než jedinci z 24 a 32 °C (Shen et al., 2017), což by mohlo poukazovat na to, že příliš velký odklon od optima, ať už směrem k vyšším či nižším teplotám, se projeví negativně.

V přirozených podmínkách není plazí embryo vystavováno jedné konstantní teplotě po celou dobu inkubace, jak se v mnoha studiích zaměřených na vliv inkubační teploty používá, a proto se někteří autoři rozhodli i při inkubaci v umělém prostředí pro kolísavou teplotu (Bowden et al., 2014). Zda je teplota konstantní nebo kolísavá může částečně ovlivnit některé vlastnosti i přesto, že průměrná teplota během inkubace zůstává v obou případech stejná. Hadi druhu *Tropidonophis mairii* inkubovaní ve variabilní teplotě byli menší, zároveň se lišili i v antipredačním chování, ale délka inkubace se nelišila (Webb et al., 2001). Při pokusu, který simuloval útěk před predátorem, byla měřena rychlost plavání a tendence schovat se pod kámen. Hadi inkubovaní ve variabilní teplotě se během pokusu vícekrát zastavili a méně využili

možnost se schovat do bezpečného úkrytu. U scinků druhu *Plestiodon chinensis* měla kolísavá teplota negativní vliv na hmotnost a délku těla, rovněž vedla i k delší inkubační době než u scinků z konstantní teploty, nicméně neměla vliv na úspěšnost vylíhnutí (Shen et al., 2017). U želv druhu *Apalone mutica* sice inkubace u jedinců z kolísavé teploty trvala déle, ovšem mláďata poté plavala rychleji než mláďata z konstantní teploty (Ashmore & Janzen, 2003). Naopak při experimentu s leguánky stepními (*Sceloporus undulatus*) se mláďata inkubovaná v kolísavé teplotě a konstantní teplotě o stejném průměru příliš nelišila v hmotnosti, délce těla či růstu (Andrews et al., 2000). Obecně však lze konstatovat, že pozorované rozdíly ve výše zmíněných studiích nebyly příliš velké, tudíž nejspíše příliš neovlivní přežívání a fitness jedince.

Důležité může být i dočasné zvýšení teploty, jak se ukazuje v experimentu se scinky druhu *Bassiana duperreyi*, kde byla vajíčka rozdělena do několika skupin – jedna byla po celou dobu vystavena jedné relativně chladné teplotě (17 ± 5 °C), některá vajíčka byla v určité fázi vývoje umístěna na dva týdny do jedné z vyšších teplot (22 ± 5 nebo 27 ± 5 °C) a poté zase vrácena do chladnějšího inkubátoru. Dřívější vystavení jedné z vyšších teplot zdvojnásobilo úspěšnost líhnutí. Zároveň dočasné zvýšení teploty mělo i pozitivní vliv na velikost těla a rychlost pohybu, a to zejména u jedinců vystavených nejvyšší teplotě v ranější fázi vývoje (Shine & Elphick, 2001). Inkubační teplota má zřejmě odlišně silný vliv během různých fází vývoje a rozdíly, které jsou pozorovány mezi jedinci z různých inkubačních teplot ve výše zmíněných studiích, mohou být způsobeny rozdílnou teplotou v určitém kritickém období vývoje, zatímco po zbytek inkubační doby už inkubační teplota nemusí mít tak výrazný vliv.

I přesto, že inkubační teplota může ovlivnit řadu vlastností, nejsou zcela známy mechanismy, které jsou za pozorované změny zodpovědné. Pravděpodobnými kandidáty jsou regulace genové exprese a intenzita metabolismu. Důkladnější srovnání a formulaci jednoznačných závěrů komplikuje fakt, že pozorované efekty jsou většinou druhově specifické. Jednotlivé studie jsou navíc zpravidla zaměřeny na jeden druh a analyzují vliv inkubační teploty na jednu či několik málo vlastností. Většina studií je zaměřená pouze na mláďata, a tak není jisté, zda pozorovaný vliv přetrvává po celý život. Při pokusu se scinky druhu *Bassiana duperreyi* byly rozdíly ve velikosti těla mezi jedinci z obou skupin po šesti týdnech malé, zatímco rozdíly v rychlosti pohybu přetrvávaly (Elphick & Shine, 2006). Rozdíly v aktivitě a pohybu užovek býčích (*Pituophis melanoleucus*) přetrvávaly dokonce až 24 měsíců (Burger, 1989). I v případě, že by změny nebyly dlouhodobé, zcela jistě mají vliv na fitness, jelikož rychlost pohybu, prostorová orientace či schopnost lovu mohou silně ovlivnit schopnost přežít.

1.2. Kognitivní schopnosti plazů

Ačkoli se v poslední době věnuje kognitivním schopnostem plazů mnohem větší pozornost než dříve, stále je v porovnání s ptáky či savci dat o kognitivních schopnostech plazů málo, navíc se většina výzkumu kognitivních schopností týká jen několika druhů. I přes to, že byly jejich kognitivních schopnosti dříve podceňovány, jsou plazi schopni obstát i v některých úlohách, které se používají pro savce či ptáky.

Nejvíce pozornosti bylo věnováno prostorové orientaci, nejčastěji se jednalo o pokusy, při kterých se zvíře učí orientovat v bludišti či se učí pozici správného úkrytu (např. López et al., 2000; Paulissen, 2008; Wilkinson et al., 2007). Někteří plazi jsou schopni se orientovat podle různých kompasů. Tento typ navigace byl zkoumán především u mořských želv, které využívají magnetický kompas při svých migračních cestách (např. Lohmann & Lohmann 1993; Lohman et al., 2012). Několik málo prací se věnovalo i jiným druhům kompasů, jako je sluneční kompas u želvy ozdobné (*Chrysemys picta*) (DeRosa & Taylor, 1978) či hvězdný kompas u aligátora severoamerického (*Alligator mississippiensis*) (Murphy, 1981).

Úlohy zkoumající schopnost asociativního učení u plazů jsou převážně orientované na klasické podmiňování spojené s barvami. Zvířeti jsou prezentovány dva stimuly, například barevně odlišené předměty či úkryty, a zvíře by si mělo asociovat určitou barvu s odměnou. Například karety obecné (*Caretta caretta*) byly odměňovány potravou, pokud si v bludišti tvaru Y vybrali rameno osvětlené správnou barvou (Young et al., 2012). Lepoještěři pestří (*Calotes versicolor*) se naučili asociovat si barvu nádoby s preferovanou potravou (Shanbhag et al., 2010).

Složitější jsou úlohy zaměřené na operantní podmiňování, při kterých si musí zvíře asociovat s odměnou svoje chování. Při těchto úlohách musí zvíře manipulovat s nějakým objektem či součástí arény. Při některých pokusech brání nějaký předmět dosažení potravy a úkolem zvířete je daný předmět odstranit. Například scinkové druhu *Bassiana duperreyi* se naučili manipulovat s víčkem, které zakrývalo nádobu ukrývající potravu (Clark et al., 2014), stejnému úkolu se dokázali naučit i anolisové druhu *Anolis evermanni* (Leal & Powell, 2012). Želvy Nelsonovy (*Pseudemys nelsoni*) se naučily manipulovat s lahví, pod kterou se ukrývala potrava (Davis & Burghardt, 2007). V jiných pokusech se musí zvíře dotknout předmětu, který přímo neskrývá potravu, ale za manipulaci s ním dostane odměnu. Takto se naučily například krajty poddruhu *Python molurus bivittatus* stisknout tlačítko za odměnu, kterou byla potrava (Emer et al., 2015). Želvy sloní (*Chelonoidis nigra*) a želvy obrovské (*Aldabrachelys gigantea*) se

naučily za účelem získání potravy dotknout se barevného předmětu na tyči, kterou držel examinátor (Gutnick et al., 2020).

Některé práce se zaměřily na sociální učení u plazů. Želva uhliřská (*Geochelone carbonaria*) je schopna sledovat pohled jiného jedince, což je důležitý předpoklad pro sociální učení (Wilkinson et al., 2010a). Tato želva je rovněž schopna se učit od jiného jedince stejného druhu pozici potravy, kterou ze své pozice nevidí (Wilkinson et al., 2010b). Agamy vousaté (*Pogona vitticeps*) se naučily pozorováním jedince stejného druhu otevírat dvířka vedoucí k potravě (Kis et al., 2015). Výsledky těchto studií ukazují, že ačkoli jsou plazi ve většině případů solitárními druhy, jsou schopni se za určitých podmínek učit od jedinců stejného druhu.

Většina pokusů byla prováděna na několika druzích želv a šupinatých, proto nelze porovnat úroveň kognitivních schopností mezi různými skupinami plazů. Zároveň nebyla věnována stejná pozornost jednotlivým typům kognitivních úloh. Například prací zaměřených na sociální učení či operantní podmiňování je mnohem méně než prací zaměřených na prostorovou orientaci. Nicméně lze tvrdit, že plazi jsou schopni obstát v rozličných kognitivních úlohách, orientovat se v bludišti a nalézt správný úkryt, asociovat si určitý podnět s odměnou, naučit se manipulovat s předměty, či se dokonce učit od jedinců stejného druhu.

Často se dávala úroveň kognitivních schopností do souvislosti s velikostí mozku, ale velikost mozku je velmi ovlivněná velikostí těla, a větší velikost mozku, a to jak absolutní, tak relativní, nemusí souviset s lepšími kognitivními schopnostmi či různě složitým chováním (Healy & Rowe, 2007; Chittka & Niven, 2009). V poslední době se jako o možném ukazateli kognitivních schopností uvažuje o počtu neuronů v kortexu (Dicke & Roth, 2016; Herculano-Houzel, 2017; Němec & Osten, 2020). Ovšem pro plazy není dostatek dat ani pro velikost mozku a kognitivní schopnosti, podle kterých by se dal případný vztah mezi nimi posoudit, v případě počtu neuronů je situace ještě horší. Kupříkladu želvy, které jsou často používány v různých kognitivních úlohách, mají malou relativní velikost mozku ve srovnání s jinými plazy (což je však zkresleno hmotností krunýře), a krokodýli, kteří mají největší absolutní velikost mozku mezi plazy, začali být pro testování kognitivních schopností používáni teprve velmi nedávno (Mathias Osvath, nepublikovaná data).

2. CÍLE PRÁCE

Cíle této diplomové práce jsou následující: 1) zhodnotit vliv inkubační teploty na kognitivní schopnosti mláďat gekonů druhu *Paroedura picta*, 2) posoudit, zda případný vliv přetrvává do dospělosti, 3) u testovaných jedinců stanovit pomocí izotropní frakcionace počty neuronů a nonneurálních buněk v celém mozku a několika jeho částech, 4) zjistit, zda inkubační teplota ovlivnila velikost mozku a počty neuronů.

3. METODIKA

3.1. Inkubace

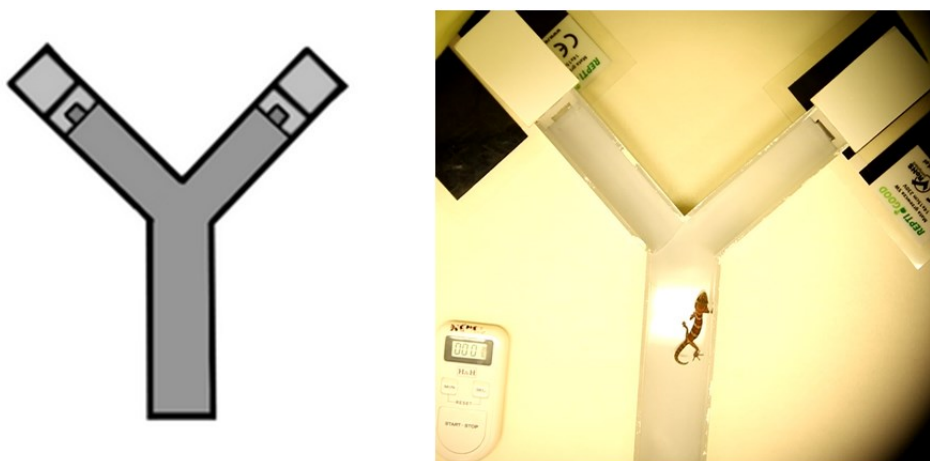
Jako modelový organismus pro testování vlivu inkubační teploty na kognitivní schopnosti a počet neuronů byl vybrán gekon druhu *Paroedura picta* kvůli poměrně snadnému chovu a manipulaci, pravidelným snůškám dvou vajíček a genetickému určení pohlaví. Vajíčka byla odebírána celkem od 14 různých samic po dobu téměř tří měsíců. K získání požadovaného počtu zvířat pro testování bylo inkubováno celkem 145 vajíček ve dvou různých teplotách, 24 °C („studená skupina“) a 30 °C („teplá skupina“), což jsou pro tento druh téměř krajní hodnoty umožňující zdárné dokončení vývoje. Vajíčka se líhnou při inkubační teplotě 22-32 °C (Blumberg et al., 2002). Jelikož samice snášejí ve většině případů dvě vejce, z každé snůšky bylo umístěno jedno vejce do inkubátoru s nižší teplotou a druhé do inkubátoru s vyšší teplotou, aby bylo možné odlišit vliv snůšky od experimentálního zásahu. Inkubátory byly kontrolovány každý den, nově vylíhnutí gekoni byli tentýž den zváženi a změřeni.

Z původního počtu 145 inkubovaných vajíček se vylíhlo pouze 83 gekonů, z nichž do testování bylo zahrnuto celkem 51. Nízká líhivost a vysoká mortalita mláďat byla zejména u gekonů inkubovaných v chladnější teplotě. Rozdíl v době inkubace mezi skupinami byl až dvojnásobný, gekoni s vyšší inkubační teplotou se líhli průměrně po 49 dnech, zatímco gekoni s nižší inkubační teplotou se líhli průměrně až po 100 dnech. Všichni gekoni byli po celou dobu experimentu chováni za stejných podmínek v místnosti s průměrnou teplotou 26 °C. Každý gekon byl chován odděleně v nádobě o rozměrech 18x13x6,5 cm s úkrytem a miskou na vodu a krmen dvakrát týdně *ad libitum* cvrčky přiměřenými jeho velikosti. Kognitivní úlohy byly prováděny vždy ve stejné místnosti, kde byla udržována teplota cca 24 °C.

3.2. První kognitivní úloha – test učení v Y bludišti

Mláďata byla ve 14 dnech po vylíhnutí testována v první úloze testující prostorovou orientaci, kterou bylo bludiště ve tvaru Y. V každém ramenu byl úkryt, ve kterém byla teplota vyšší než ve zbytku bludiště, čehož bylo dosaženo pomocí zahřívacích podložek umístěných pod bludištěm. Obě ramena byla zahřívána stejně, aby se zamezilo možnosti, že se gekon bude orientovat podle teplotního gradientu. Pouze úkryt ve správném rameni byl přístupný, kdežto úkryt v opačném rameni byl zevnitř zalepen průhlednou páskou, tudíž se gekon nemohl dostat dovnitř.

Před samotným testováním byl gekon zvážen a poté následovala explorace, při které se mohl gekon volně pohybovat po bludišti po dobu 5 minut a seznámit se s bludištěm. Následně byl proveden preferenční test, jehož účelem bylo zjistit, které rameno si gekon přednostně vybere, a zároveň byl změřen čas, za který gekon stimulovaný doteky štětce na ocas proběhl bludištěm. Při samotném testování byl pak zpřístupněn úkryt v opačném rameni, než si gekon zvolil v těchto přípravných fázích, případně v rameni, které zvolil v posledním pokusu, pokud vykazoval alternaci. Cílem bylo zmírnit zkreslení výsledků preferencí pro pravou či levou stranu.



Obrázek 1. Schéma bludiště (vlevo) a gekon v bludišti při pokusu (vpravo).

Zvířata byla testována celkem 3 dny, každý den bylo provedeno 6 pokusů ve dvou sezeních (session), přičemž mezi 3. a 4. pokusem byla pauza minimálně 25 minut. Při pokusu bylo zvíře umístěno před bludiště a ve chvíli, kdy se všemi končetinami ocitlo v bludišti, se začal měřit čas. Pokud se gekon zastavil, byl k dalšímu pohybu vyprovokován pomocí dotyku štětce na ocasu či zádech, který simuloval útok predátora a podněcoval gekona k nalezení úkrytu. Měřil se čas potřebný k tomu, aby gekon našel otevřený úkryt, v němž mohl zůstat 5 minut, což bylo v tomto pokusu současně se zvýšenou teplotou v úkrytu používáno jako odměna. Na splnění úlohy bylo při každém pokusu vyměřeno 120 vteřin, pokud během tohoto časového intervalu nebyl gekon schopen úkryt najít, byl k němu doveden a opět byl v úkrytu ponechán pět minut. Mezi jednotlivými pokusy byla bludiště vyměňována a vymývána 70% ethanolem, aby bylo zajištěno, že se gekon nebude orientovat podle pachové stopy. Všechny pokusy, stejně jako explorace a preferenční testy, byly nahrávány na kameru.

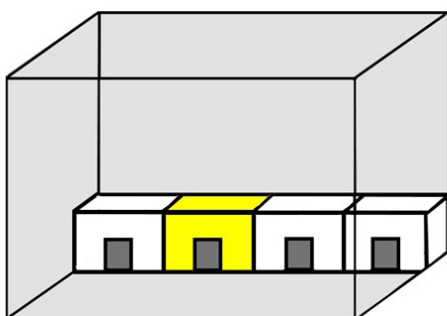
Čtvrtý den byl proveden kontrolní test, jehož účelem bylo ověření, že gekon nevidí průhlednou pásku, kterou je zalepený úkryt, a rozhoduje se pouze podle pozice. V tomto testu

byly úkryty opačně, tudíž v rameni, kde po celou dobu testování byl umístěn přístupný úkryt, byl úkryt zalepený a naopak. Zaznamenávalo se pouze to, které rameno si gekon vybral.

Dohromady bylo tímto způsobem otestováno 51 mláďat, 36 ze skupiny s vyšší inkubační teplotou a 15 ze skupiny s nižší inkubační teplotou. Z celkového počtu otestovaných mláďat bylo 32 samic, 15 samců a u 4 mláďat nebylo pohlaví zjištěno. Polovina testovaných gekonů byla po skončení testování usmrcena předávkováním anestetikem a byl jim odebrán mozek k dalšímu zpracování a odhadu počtu neuronů. Mozek byl před dalším zpracováním týden až dva týdny postfixován v PFA (4% roztok paraformaldehydu). Druhá polovina gekonů byla dochována do stáří půl roku, kdy byla testována v druhé kognitivní úloze.

3.3. Druhá kognitivní úloha – test učení v aréně

Druhou kognitivní úlohou, ve které byli testováni již dospělí půlroční gekoni, byla obdélníková aréna, ve které se nacházely čtyři úkryty umístěné vedle sebe, tři z nich měly bílou barvu a jeden měl barvu žlutou. Pouze žlutý úkryt byl přístupný, kdežto všechny bílé úkryty byly zalepené podobným způsobem jako v první úloze. Všechny úkryty byly opět vyhřívány pomocí zahřívacích podložek, aby v nich byla vyšší teplota než ve zbytku arény, což sloužilo jako odměna.



Obrázek 2. Schéma arény (vlevo) a gekon v aréně při pokusu (vpravo).

Gekoni byli nejprve umístěni do arény po dobu 5 minut za účelem explorační a seznámení s arénou. Samotné testování probíhalo 4 dny, každý den bylo provedeno 6 pokusů ve dvou sezeních (session), mezi nimiž byla pauza minimálně 25 minut. Během pokusů se pozice žlutého úkrytu střídala podle předem náhodně vygenerované sekvence, která byla shodná pro všechny testované gekony. Gekon byl vypuštěn do arény a prvních 20 vteřin

pokusu s ním nebylo nijak manipulováno, poté byl podobným způsobem jako v první úloze simulován útok predátora za použití štětce v případě, že se gekon sám nepohyboval. Během pokusu se počítaly chyby, tedy případy, kdy se gekon pokusil vejít do zalepeného bílého úkrytu, a čas potřebný k nalezení správného úkrytu, ve kterém byl poté ponechán na 5 minut. Pokud gekon do 120 vteřin od začátku pokusu nebyl schopný najít správný úkryt, byl k němu nasměrován a rovněž v něm zůstal 5 minut. Aréna byla po každém pokusu vymyta 70 % ethanolem. Všechny pokusy včetně explorační byly zaznamenávány na kameru.

V poslední den testování byl proveden kontrolní test, ve kterém byl náhodný bílý úkryt přístupný a žlutý úkryt naopak zalepený a tím nedostupný. V tomto testu se zaznamenávalo, který úkryt si gekon vybral jako první a zda výběr úkrytu není ovlivněn možností, že by gekoni viděli průhlednou bariéru, kterou byly zakryté bílé úkryty, což by mohlo ovlivnit jejich volbu. Kontrolní test prokázal, že gekoni bariéru neviděli. V druhé úloze bylo dohromady otestováno 23 dospělých gekonů, 16 ze skupiny s vyšší inkubační teplotou a 7 ze skupiny s nižší inkubační teplotou. Z celkového počtu otestovaných dospělých gekonů bylo 15 samic a 8 samců. Po skončení testování byli gekoni usmrceni a byl jim odebrán mozek za účelem odhadu počtu neuronů. Mозek byl stejně jako v případě mláďat týden až dva týdny postfixován v PFA.

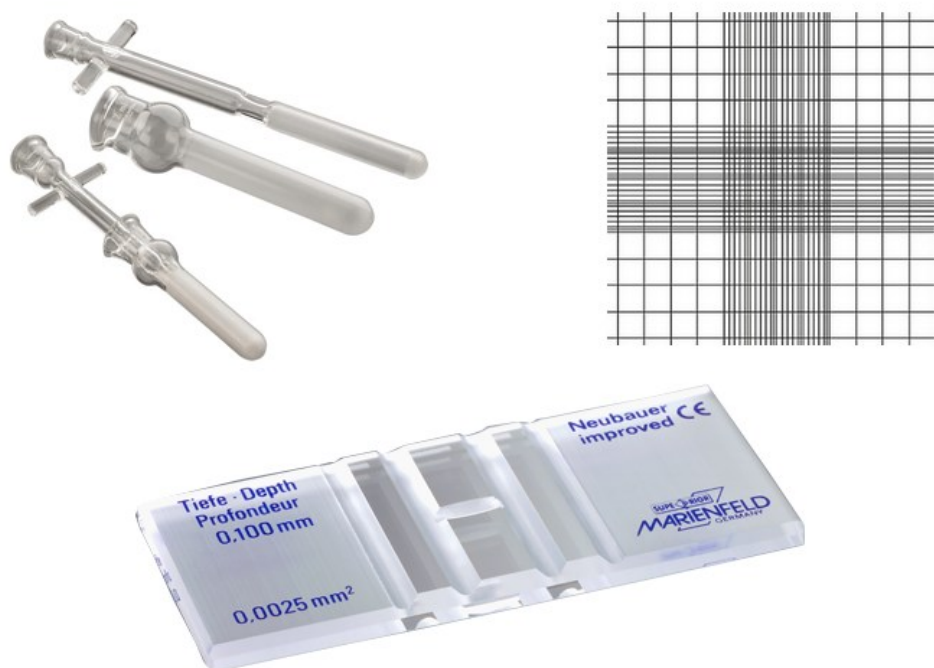
3.4. Odhad počtu neuronů

Mozky čtrnáctidenních mláďat byly rozděleny na dvě části: hemisféry koncového mozku a zbytek mozku, v případě půlročních gekonů byl mozek rozdělen na šest částí: čichové laloky, hemisféry koncového mozku, mezimozek, mozeček, optické tectum a mozkový kmen. Pro odhad počtu neuronů a gliových buněk byla použita metoda izotropní frakcionace (Herculano-Houzel & Lent, 2005), která umožňuje zjistit počet neuronů a ostatních buněk v jakékoli struktuře mozku. Princip metody spočívá v mechanické homogenizaci nervové tkáně. Vysoce heterogenní tkáň je převedena v homogenní suspenzi jader, která pak mohou být imunochemicky značena a počítána. Do současné doby byl touto metodou zjištěn počet neuronů u mnoha druhů, především savců a ptáků (např. Herculano-Houzel et al., 2006, 2007; Olkowicz et al., 2016), u plazů byl zjištěn nejprve u krokodýla nilského (*Crocodylus niloticus*) (Ngwenya et al., 2016), v naší laboratoři jsme stanovili počty neuronů u více než 100 druhů plazů (Kverková et al., v přípravě).

Postup izotropní frakcionace je následující. Analyzovaná mozková struktura je zpracována manuálně v homogenizátoru, ve kterém dojde k zničení buněčných membrán a

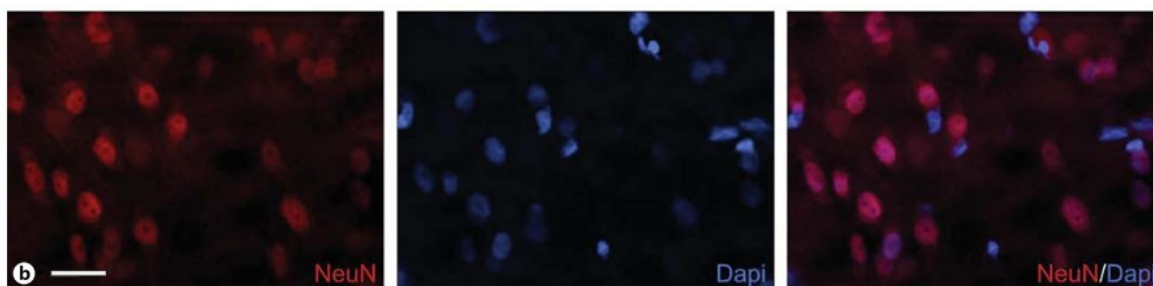
uvolní se tak jádra. Každá část mozku byla homogenizována přibližně 20-35 minut v homogenizátoru s disociačním roztokem (40 mM roztok citrátu sodného s 1% Tritonu X-100). Po ukončení homogenizace byl roztok přenesen z homogenizátoru, který byl následně ještě vymyt disociačním roztokem, aby se omezila ztráta jader, která zůstala na jeho stěně a pístu, poté byl výsledný objem suspenze změřen automatickou pipetou (Eppendorf Xplorer).

Jádra ve vzniklé homogenní směsi o známém objemu byla fluorescenčně značena pomocí DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol), které se váže na AT bohaté oblasti v DNA, a byla počítána v 10 μ l alikvótách v Neubauerově počítací komůrce (Karl Hecht GmbH & Co KG) pomocí fluorescenčního mikroskopu (Olympus BX51) opatřeného vhodnými fluorescenčními filtry (U-MWU2 pro DAPI a U-MWG2 pro Alexa Fluor). Před nanesením vzorku na počítací komůrku byla suspenze řádně promíchána, aby byla skutečně homogenní. Spočítána byla všechna jádra nacházející se v poli počítací komůrky, u kterého je známý přesný objem. Tento postup byl opakován nejméně čtyřikrát, pokud byl variační koeficient menší než 5 %, v opačném případě byly spočítány další čtyři vzorky, výsledný variační koeficient byl vždy nižší než 10 %. Průměrný počet buněk v poli byl vynásoben celkovým objemem homogenátu, z čehož byl vypočten počet jader v celé suspenzi.



Obrázek 3. Pomůcky k izotropní frakcionaci: homogenizátor (vlevo nahoře), Neubauerova počítací komůrka (dole) a mřížka komůrky (vpravo nahoře). Foto: informační materiály výrobců.

K odhadu počtu neuronů byla odebrána zhruba polovina suspenze, aby byl ve vzorku dostatečný počet jader, ale aby zároveň bylo možné v případě neúspěchu proces značení neuronů opakovat. Druhá polovina byla v nemrznoucí směsi (30% glycerol, 30% ethylenglykol, 40% fosfátový pufr) uložena v mrazáku pro případné další zpracování. Nejdříve byl vzorek promýván fyziologickým roztokem PBS (fosfátový pufr s chloridem sodným o koncentraci 0,317 a pH 7,4). Vzorek byl nejprve zcentrifugován (4 minuty, 3200 otáček/s), pomocí pipety opatrně odebrán supernatant, aby na dně zbyla pouze peleta jader. Poté byl přidán 1ml PBS, vzorek byl promíchán a opět zcentrifugován. Tento postup se opakoval třikrát. Po promývání byla k vzorku přidána polyklonální primární protilátka Anti-NeuN (Merck Millipore) v poměru 1:800 a 5 % kozího séra a vzorek se nechal inkubovat přes noc při 4°C. Tato protilátka se váže na protein NeuN, který se vyskytuje v jádrech většiny neuronů (Mullen et al., 1992). Poté byl vzorek opět třikrát promyt, aby se vymyla nenačnaná protilátka, místo PBS bylo ale použito PBSTx (PBS s 0,01 % Tritonu). Po promytí byla k vzorku přidána sekundární protilátka konjugovaná s fluorescenční barvou Alexa Fluor 594 (Life Technologies), opět v poměru 1:800, a DAPI a vzorek se nechal alespoň hodinu inkubovat v pokojové teplotě na míchačce. Vzorek byl opět třikrát promyt PBSTx a nakonec bylo přidáno PBS na požadovaný objem. Pomocí fluorescenčního mikroskopu byl stanoven poměr neuronů a gliových buněk. Nejméně u 500 buněk bylo rozhodnuto, zda se jedná o neuron (jádro bylo značeno DAPI i protilátkou NeuN) či non-neurální (gliovou nebo endotelovou) buňku (jádro bylo značeno pouze DAPI). Ze zjištěného poměru byl vypočten počet neuronů a gliových buněk v celé struktuře.



Obrázek 4. Jádra buněk značená protilátkou anti-NeuN (vlevo), DAPI (uprostřed) a sloučený obraz (vpravo), kterého lze v mikroskopu dosáhnout také pomocí duálního filtru. Převzato z Ngwenya et al., 2016.

Analýza dat

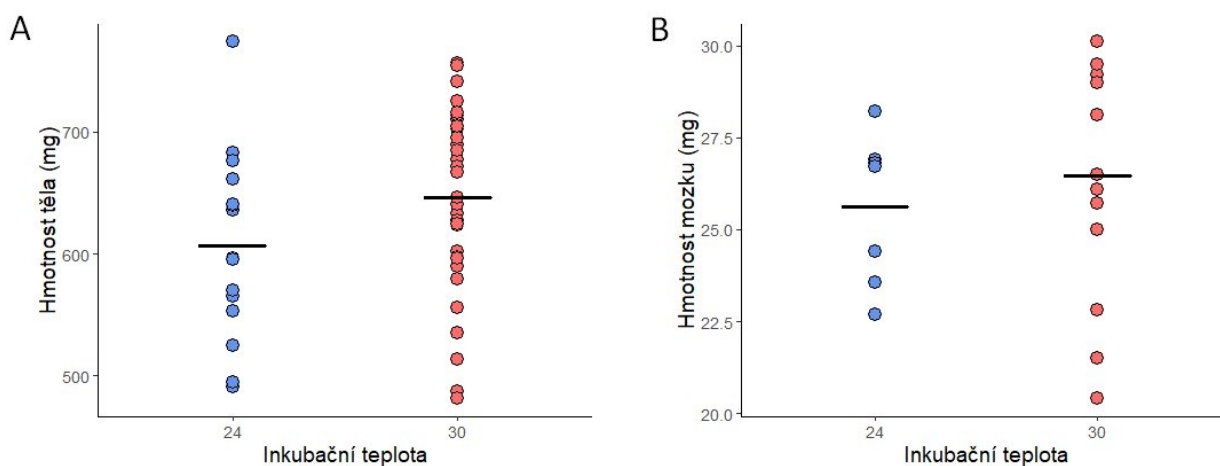
Pro analýzu všech dat a vytvoření grafů byl použit jazyk R 4.0.2. (R Core Team, 2020). Pro vyhodnocení výsledků byly použity lineární smíšené modely (LMM), kde bylo jako náhodný efekt použito ID matky, vzhledem k tomu, že někteří testovaní jedinci byli sourozenci. Hladina významnosti byla stanovena na hodnotu $\alpha=0,05$. Obrázky byly upraveny ve vektorovém editoru InkScape.

4. VÝSLEDKY

4.1. Vliv inkubační teploty u mláďat

Do první kognitivní úlohy bylo zahrnuto 51 mláďat, 36 mláďat z inkubační teploty 30 °C a 15 mláďat z inkubační teploty 24 °C. Nerovnoměrný podíl mezi jednotlivými skupinami byl zapříčiněn vysokou mortalitou u mláďat z nižší inkubační teploty, některá vylíhnutá mláďata se nedožila 14 dnů, kdy měla být testována v první kognitivní úloze.

Gekoni z různých inkubačních teplot se lišili hmotnostmi, ačkoli rozdíl nedosáhl statistické významnosti ($n=49$, LMM: $p=0,09$). V den vylíhnutí byla průměrná hmotnost gekona z vyšší inkubační teploty $646 \pm 74,9$ mg, zatímco u gekonů z nižší inkubační teploty byla průměrná hmotnost $607 \pm 77,2$ mg. Při druhém vážení v 14 dnech před testováním v první kognitivní úloze vážili průměrně jedinci z vyšší inkubační teploty 891 ± 161 mg, jedinci z nižší inkubační teploty 813 ± 191 mg. Lišil se tedy i přírůstek hmotnosti od vylíhnutí do prvního testování, u jedinců z inkubační teploty 30 °C se hmotnost zvýšila průměrně o 253 ± 140 mg, u jedinců z inkubační teploty 24 °C o 206 ± 158 mg, rozdíl však nebyl statisticky signifikantní ($n=46$, LMM: $p=0,316$). Jedinci z různých teplot se nelišili v délce těla ($n=39$, LMM: $p=0,547$), SVL (snout-vent length) u gekonů z vyšší teploty bylo průměrně $29,1 \pm 1,3$ mm, u gekonů z nižší teploty $28,7 \pm 0,9$ mm. Zároveň se mláďata nelišila v hmotnosti mozku ($n=20$, LMM: $p=0,612$). V případě gekonů z nižší inkubační teploty byla průměrná hmotnost mozku $25,61 \pm 2,05$ mg, v případě gekonů z vyšší inkubační teploty $26,46 \pm 3,29$ mg.



Obrázek 5. (A) Hmotnost těla u mláďat z různých inkubačních teplot ($p=0,09$); (B) Hmotnost mozku u mláďat z různých inkubačních teplot ($p=0,612$).

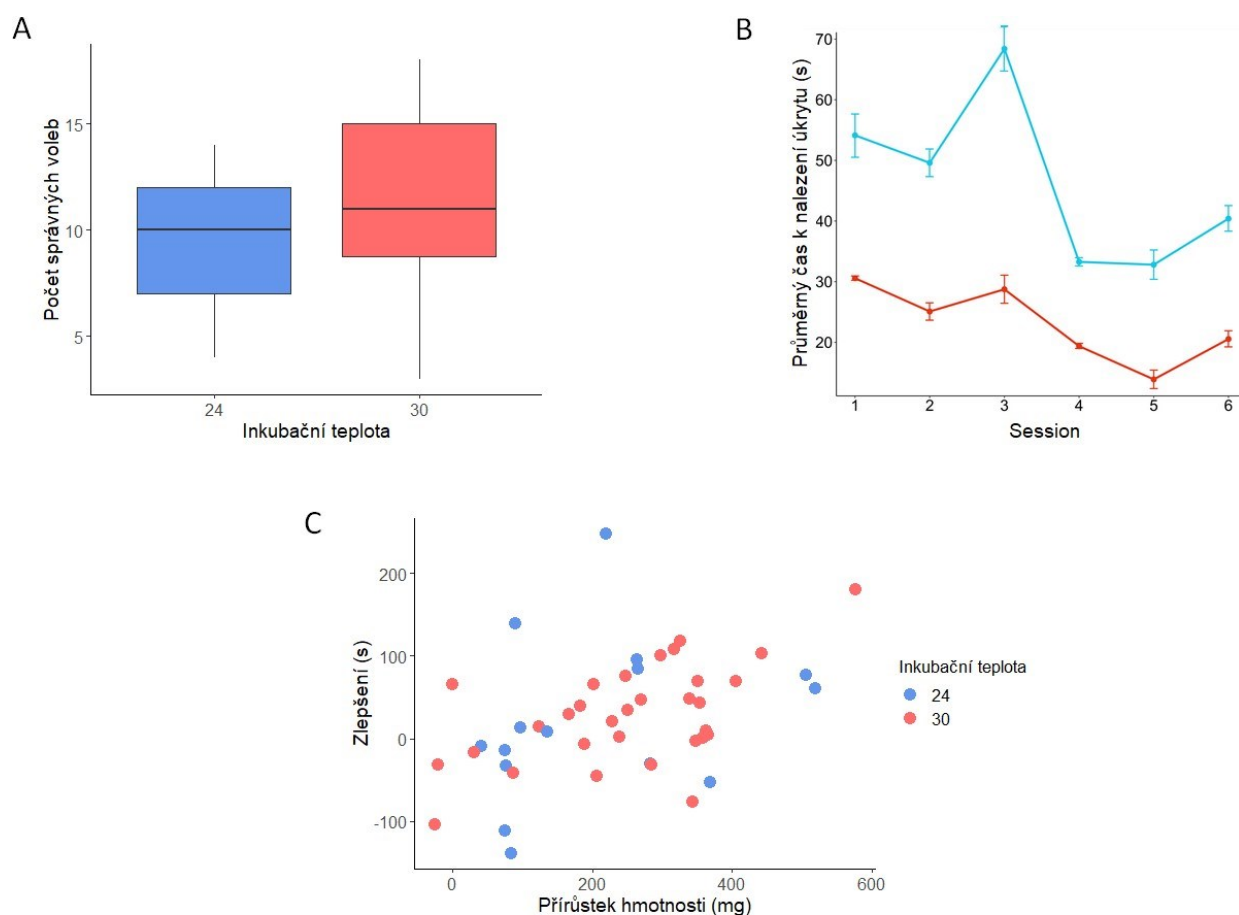
V první kognitivní úloze, kterou bylo bludiště tvaru Y, byl měřen čas potřebný k nalezení úkrytu a zároveň počet voleb správného ramene. Každý gekon byl testován tři dny po šesti pokusech. Mezi skupinami nebyl výrazný rozdíl v celkové úspěšnosti napříč všemi pokusy ($n=51$, LMM: $p=0,1$). Průměrná úspěšnost, tedy případy, kdy si jedinci vybrali správné rameno, byla u gekonů s nižší inkubační teplotou $9,5 \pm 3$ (53 %), u gekonů s vyšší inkubační teplotou $11,3 \pm 4$ (63 %) z celkových 18 pokusů. Skupiny se příliš nelišily ani v úspěšnosti v posledním dni testování (LMM: $p=0,124$) – průměrná úspěšnost byla u „studené skupiny“ $3,1 \pm 1,3$ (51,7%), u „teplé skupiny“ $3,8 \pm 1,5$ (63 %) z počtu šesti pokusů.

Inkubační teplota signifikantně ovlivnila celkový čas potřebný k nalezení správného úkrytu ve všech pokusech ($n=51$, LMM: $p<0,01$), gekoni z chladnější inkubační teploty průměrně potřebovali 686 ± 298 vteřin ve všech 18 pokusech, zatímco gekoni z teplejší inkubační teploty potřebovali průměrně 436 ± 182 vteřin. Nelišil se přitom průměrný čas v prvních třech pokusech ($n=51$, LMM: $p=0,418$), zatímco rozdíl v posledních třech pokusech se pohyboval na hranici statistické významnosti ($n=51$, LMM: $p=0,091$). Inkubační teplota ovšem signifikantně ovlivnila rychlost pohybu ($n=46$, LMM: $p<0,01$), která byla měřena před samotným testováním v úloze. Gekoni z vyšší inkubační teploty potřebovali průměrně $6,2 \pm 6,72$ vteřin na proběhnutí celým bludištěm, zatímco gekoni z nižší inkubační teploty potřebovali průměrně $29,2 \pm 29,16$ vteřin. Rychlost pohybu nekorelovala s hmotností těla ($n=46$, LMM: $p=0,789$) či délkou těla (LMM: $p=0,625$), naopak korelovala s celkovým časem potřebným ve všech pokusech v první kognitivní úloze ($n=46$, LMM: $p=0,004$).

Průměrné zlepšení během testování, rozdíl mezi celkovým časem v prvních třech pokusech a celkovým časem v posledních třech pokusech, se mezi skupinami signifikantně nelišilo (LMM: $p=0,67$), ačkoli je tu trend k většímu zlepšení u gekonů z „teplé“ skupiny, gekoni z nižší inkubační teploty se průměrně zlepšili o $22,33 \pm 98,2$ vteřin, gekoni z vyšší inkubační teploty o $32 \pm 60,2$ vteřin. Zlepšování nejtěsněji korelovalo s přírůstkem hmotnosti od vylíhnutí po první den testování ($n=46$, LMM: $p=0,0034$), který by mohl odrážet obecnou zdatnost jedince, což by se mohlo odrazit i na rychlosti pohybu a učení. Dále zlepšení korelovalo i s rychlostí pohybu ($n=46$, LMM: $p=0,013$). Pohlaví jedince neovlivnilo počet správných voleb během celého testování ($n=47$, LMM: $p=0,793$), ani celkový čas ve všech pokusech ($n=47$, LMM: $p=0,369$).

Tabulka 1. Přehled morfologických vlastností a výsledků v kognitivní úloze u mláďat z různých inkubačních teplot

Inkubační teplota	Hmotnost těla při vylihnutí (mg)	Přírůstek hmotnosti (mg)	SVL (mm)	Hmotnost mozku (mg)	Celková úspěšnost	Rychlost (s)	Celkový čas (s)	Zlepšení (s)
24°C	607 ± 77,2	206 ± 158	28,7 ± 0,93	25,61 ± 2,05	9,5 ± 3	29,2 ± 29,16	686 ± 298	22,3 ± 98,2
30°C	646 ± 74,9	253 ± 140	29,1 ± 1,3	26,46 ± 3,29	11,3 ± 4	6,2 ± 6,72	436 ± 182	32 ± 60,2



Obrázek 6. (A) Počet pokusů, při kterých si gekon vybral správné rameno, u „studené“ a „teplé“ skupiny ($p=0,01$); (B) Průměrný čas k nalezení správného úkrytu v jednotlivých částech testování u gekonů z nižší (modrá barva) a vyšší (červená barva) inkubační teploty ($p<0,01$); (C) Vztah mezi přírůstkem hmotnosti a zlepšením, rozdílem mezi celkovým časem mezi prvními a posledními třemi pokusy ($p=0,0034$).

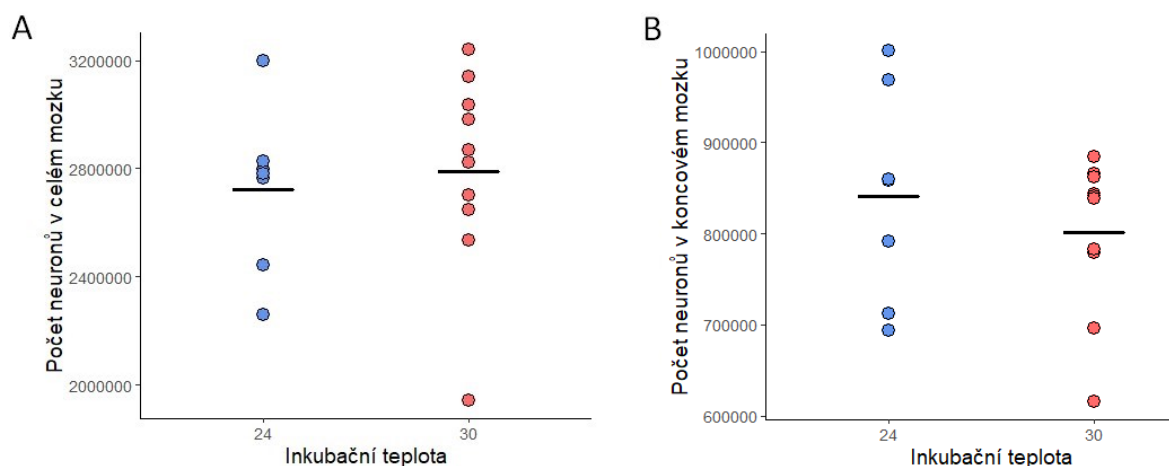
Kvantifikace neuronů pomocí izotropní frakcionace byla provedena u 17 mláďat, která byla otestována v první kognitivní úloze, 10 jedinců bylo ze skupiny s vyšší inkubační teplotou a 7 ze skupiny s nižší inkubační teplotou. Mozek byl vzhledem k malé velikosti rozdělen pouze na dvě části, na hemisféry koncového mozku a zbytek mozku. U mláďat hmotnost mozku

nekorelovala s hmotností těla (n=20, LMM: p=0,439), zároveň nebyl rozdíl mezi pohlavími ani ve velikosti mozku (n=20, LMM: p=0,547), ani ve velikosti těla (n=45, LMM: p=0,637). Počet neuronů nekoreloval s hmotností mozku (n=17, LMM: p=0,654), ani s hmotností těla (LMM: p=0,85) či délkou těla (n=13, LMM: p=0,0689).

Skupiny se mezi sebou výrazně nelišily v počtu neuronů v celém mozku (n=17, LMM, p=0,837) a v koncovém mozku (LMM, p=0,438), ani v počtu gliových buněk v celém mozku (n=17, LMM, p=0,477) či v koncovém mozku (LMM, p=0,432). Variabilita v počtu nervových a gliových buněk byla rovněž u obou skupin podobná. U gekonů z chladné inkubační teploty bylo relativní variační rozpětí [počítáno jako $(N_{\max} - N_{\min}) / (N_{\max} + N_{\min})$] neuronů v koncovém mozku 0,181, ve zbytku mozku 0,259, v celém mozku dohromady pak 0,172. U gekonů z teplé inkubační teploty bylo relativní variační rozpětí neuronů v koncovém mozku 0,180, ve zbytku mozku 0,288, v celém mozku dohromady 0,251. Relativní variační rozpětí nonneurálních buněk v celém mozku bylo u gekonů ze „studené skupiny“ 0,217, u gekonů z „teplé skupiny“ 0,271. Počet neuronů a gliových buněk u všech mláďat, pro které byl proveden odhad počtu neuronů, je uveden v Tabulce 2. Výsledky v kognitivní úloze, jako jsou celkový čas (n=17, LMM: p=0,74), počet správných voleb (LMM: p=0,56) či míra zlepšení (LMM: p=0,89), nebyly závislé na počtu neuronů.

Tabulka 2. Počet neuronů a gliových buněk u mláďat gekonů testovaných v první kognitivní úloze

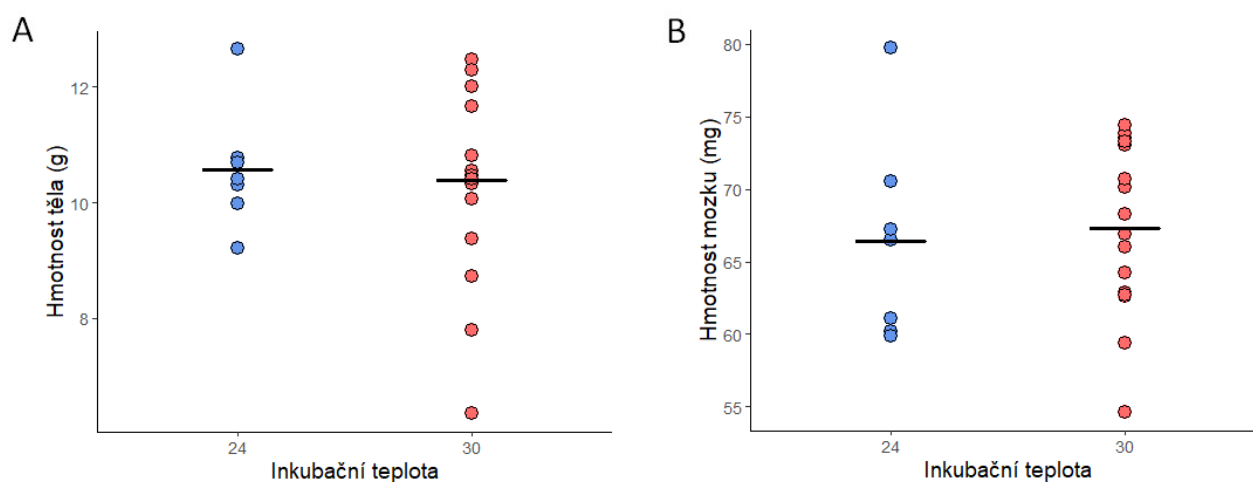
ID gekona	Inkubační teplota	Počet neuronů v koncovém mozku	Počet neuronů ve zbytku mozku	Celkový počet neuronů	Počet gliových buněk v koncovém mozku	Počet gliových buněk ve zbytku mozku	Celkový počet gliových buněk
29	30°C	865 800	1 668 300	2 534 100	984 200	3 311 700	4 295 900
49		779 312	2 041 774	2 821 086	1 058 188	2 986 976	4 045 164
65		843 040	2 190 552	3 033 592	1 072 960	3 171 208	4 244 168
79		861 520	2 277 375	3 138 895	1 074 480	3 795 125	4 869 605
83		840 616	2 397 930	3 238 546	925 674	3 567 285	4 492 959
91		615 195	1 325 388	1 940 583	397 605	2 397 747	2 795 352
101		783 144	2 197 464	2 980 608	968 052	2 438 931	3 406 983
109		696 136	1 950 110	2 646 246	1 039 364	3 154 630	4 193 994
111		884 700	1 985 148	2 869 848	1 081 946	3 027 382	4 109 328
127		838 080	1 864 940	2 703 020	890 420	2 978 735	3 869 155
68	24°C	968 484	1 474 315	2 442 798	806 596	2 397 420	3 204 017
72		712 132	1 548 645	2 260 777	705 893	3 019 630	3 725 523
74		791 363	2 008 155	2 799 517	971 138	3 749 170	4 720 308
76		858 006	1 904 909	2 762 915	950 225	2 833 671	3 783 896
114		859 894	1 920 509	2 780 403	997 328	2 880 764	3 878 092
128		1 000 180	1 824 693	2 824 874	1 009 425	3 796 667	4 806 091
146		693 945	2 504 691	3 198 637	736 575	4 246 499	4 983 073



Obrázek 7. (A) Počet neuronů v celém mozku mláďat gekonů z různých inkubačních teplot ($p=0,837$); (B) Počet neuronů v koncovém mozku u mláďat gekonů z různých inkubačních teplot ($p=0,438$).

4.2. Vliv inkubační teploty na dospělé gekony

V druhé kognitivní úloze bylo otestováno 23 dospělých gekonů, 16 ze skupiny s vyšší inkubační teplotou a 7 ze skupiny s nižší inkubační teplotou. Dospělí půlroční gekoni se nelišili hmotností těla ($n=23$, LMM: $p=0,919$), délkou těla (LMM: $p=0,81$), ani hmotností mozku (LMM: $p=0,636$). Gekoni z „teplé skupiny“ průměrně vážili $10,4 \pm 1,7$ g a jejich mozek průměrně vážil $67,3 \pm 5,9$ mg, průměrná hmotnost gekonů ze „studené teploty“ byla $10,6 \pm 1,05$ g a průměrná váha jejich mozku byla $66,4 \pm 7,1$.



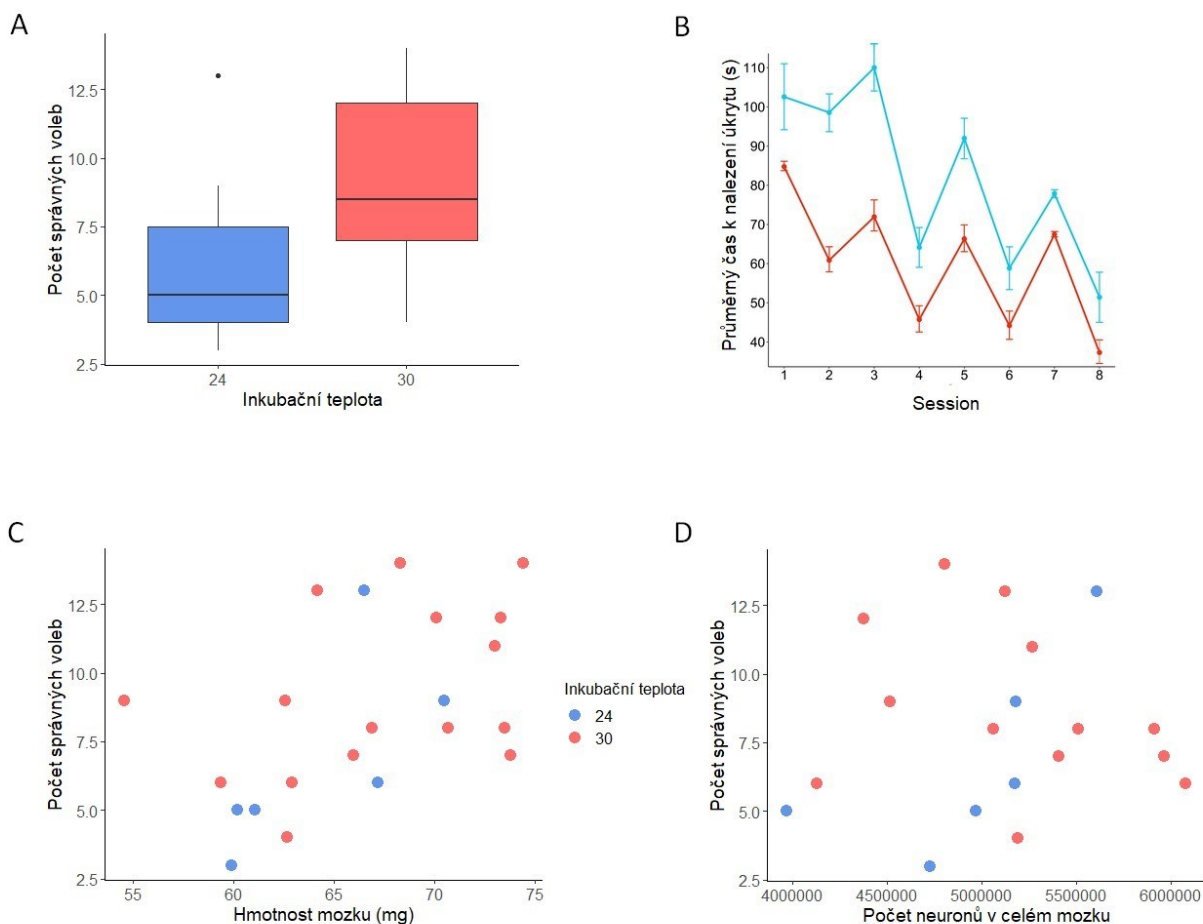
Obrázek 8. (A) Hmotnost těla u dospělých gekonů z různých inkubačních teplot ($p=0,919$); (B) Hmotnost mozku u dospělých gekonů z různých inkubačních teplot mozku ($p=0,636$).

V této úloze se neměřil pouze čas potřebný k nalezení správného žlutého úkrytu, ale rovněž se zaznamenával počet chyb, tedy situací, kdy se gekon pokusil vstoupit do některého ze zalepených bílých úkrytů. Gekoni byli testováni čtyři dny po 6 pokusech ve dvou sezeních (session), dohromady měli tedy 24 pokusů. Během celého testování udělali gekoni z chladné inkubační teploty průměrně $84 \pm 34,1$ chyb, zatímco gekoni z teplé inkubační teploty $63 \pm 29,4$ chyb ($n=24$, LMM: $p=0.0639$). Gekoni z různých teplot se stejně jako v první úloze statisticky nelišili v průměrné úspěšnosti (LMM: $p=0.0635$), tedy v počtu pokusů, ve kterých si gekon zvolil správný úkryt jako první volbu. Je však patrný trend ke zlepšení u gekonů z vyšší inkubační teploty, jejichž průměrná úspěšnost byla $9,25 \pm 3,1$, u gekonů z nižší inkubační teploty byla $6,29 \pm 3,6$. Lišil se celkový čas potřebný k nalezení úkrytu ve všech pokusech (LMM: $p=0,0264$). Gekoni ze „studené skupiny“ potřebovali více času, průměrně 1819 ± 430 vteřin, než gekoni z „teplé skupiny“, kteří potřebovali průměrně 1416 ± 366 vteřin. Ovšem počet chyb, úspěšnost a celkový čas spolu úzce souvisí, jelikož ve většině případů se s rostoucím počtem chyb v pokusu zvyšoval i čas potřebný k nalezení správného úkrytu. Gekoni z chladné inkubační teploty se průměrně zlepšili o $73,86 \pm 103$ vteřin, gekoni z teplejší inkubační teploty se průměrně zlepšili o 115 ± 92 vteřin. Stejně jako v první úloze nebylo průměrné zlepšení, rozdíl mezi celkovým časem mezi prvními třemi a posledními třemi pokusy, ovlivněno inkubační teplotou ($n=24$, LMM: $p=0,355$).

Na rozdíl od mláďat byla úspěšnost v této kognitivní úloze signifikantně ovlivněna hmotností mozku ($n=23$, LMM: $p=0,0253$). Jedinci s větší hmotností mozku měli více správných voleb, tedy ve více pokusech si vybrali jako první správný úkryt. Stejně jako v první úloze nebyl rozdíl mezi pohlavími v celkovém počtu správných voleb během celého testování ($n=23$, LMM: $p=0,882$), ani v celkovém čase nutném pro dokončení všech pokusů (LMM: $p=0,328$).

Tab. 3 – Přehled morfologických vlastností a výsledků v kognitivní úloze u dospělých gekonů z různých inkubačních teplot

Inkubační teplota	Hmotnost těla (g)	Hmotnost mozku (mg)	SVL (mm)	Počet chyb	Celková úspěšnost	Celkový čas (s)	Zlepšení (s)
24°C	$10,6 \pm 1,05$	$66,4 \pm 7,1$	$73,11 \pm 3,5$	$84 \pm 34,1$	$6,29 \pm 3,6$	1819 ± 430	$73,86 \pm 103,4$
30°C	$10,4 \pm 1,7$	$67,3 \pm 5,9$	$73,62 \pm 5$	$63 \pm 29,4$	$9,25 \pm 3,1$	1416 ± 366	$114,94 \pm 92,2$



Obrázek 9. (A) Počet správných voleb u gekonů z různých inkubačních teplot ($p=0,0636$); (B) Průměrný čas potřebný k nalezení správného úkrytu v jednotlivých částech testování u gekonů z nižší (modrá barva) a vyšší (červená barva) inkubační teploty ($p=0,0264$); (C) Vztah mezi počtem správných odpovědí a hmotností mozku ($p=0,0253$); (D) Vztah mezi počtem neuronů v celém mozku a počtem správných odpovědí ($p=0,814$).

Úspěšnost dospělců v druhé kognitivní úloze nesouvisela s úspěšností v první kognitivní úloze (LMM: $p=0,681$), tj., vysoký počet správných odpovědí v první úloze nepredikoval vysoký počet správných odpovědí v druhé úloze. Celkový čas ve všech pokusech v první kognitivní úloze rovněž nepredikoval celkový čas ve všech pokusech v druhé úloze ($n=23$, LMM: $p=0,96$). Zlepšení, rozdíl mezi časem v prvních třech a posledních třech pokusech v první kognitivní úloze, také nekorolovalo se zlepšením v úloze druhé (LMM: $p=0,936$).

Po otestování v druhé kognitivní úloze byl proveden odhad počtu neuronů a gliových buněk u 19 jedinců, z toho 13 gekonů bylo z „teplé skupiny“ a 6 jedinců bylo ze „studené skupiny“. Mozek byl rozdělen na šest částí – čichové laloky, hemisféry, mezimozek, optické

tectum, mozeček a mozkový kmen. Ani u dospělých gekonů se skupiny mezi sebou nelišily v počtu neuronů (LMM: $p=0,695$) či v počtu gliových buněk (LMM: $p=0,984$), lišily se ovšem v počtu neuronů v mozečku, který byl ovlivněn inkubační teplotou ($n = 19$, LMM: $p=0,0237$). Počet neuronů v ostatních částech mozku nebyl ovlivněn inkubační teplotou (ve všech případech: LMM: $p>0,05$).

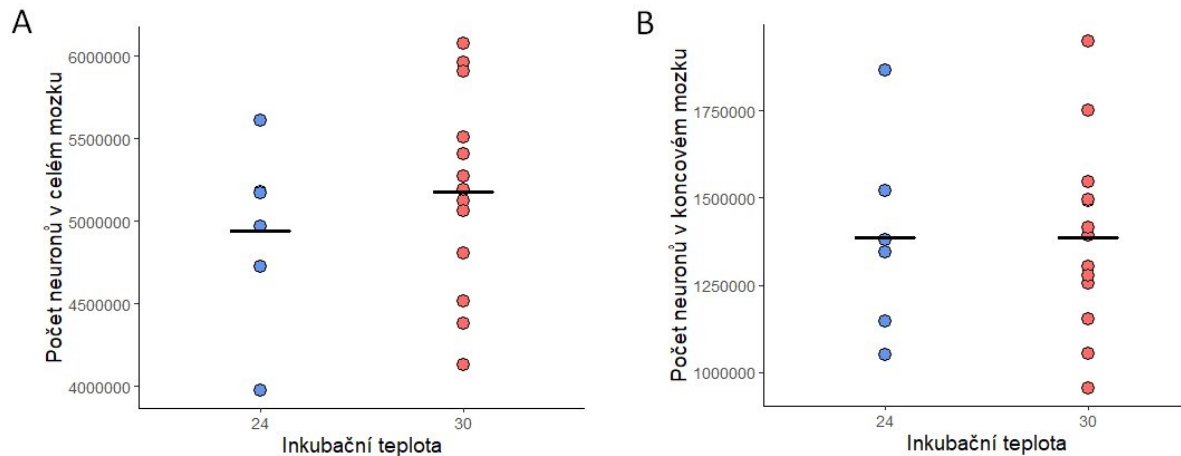
Relativní variační rozpětí (viz výše) v počtu neuronů v celém mozku u gekonů z nižší inkubační teploty bylo 0,171, v koncovém mozku 0,28, u gekonů z vyšší inkubační teploty bylo relativní variační rozpětí v počtu neuronů 0,191, a v koncovém mozku 0,344. Relativní variační rozpětí v počtu nonneurálních buněk bylo v celém mozku 0,183 u gekonů z vyšší inkubační teploty a 0,13 u gekonů z nižší inkubační teploty. Počet neuronů a nonneurálních buněk v různých částech mozku u všech jedinců, u kterých byl proveden odhad počtu neuronů, shrnují Tabulky 4 a 5. Ani v případě dospělých gekonů počet neuronů v celém mozku neovlivnil úspěšnost v kognitivní úloze ($n=23$, LMM: $p=0,464$), či celkový čas nutný k řešení úlohy (LMM: $p=0,215$). Výsledky v kognitivních úlohách nebyly závislé ani na počtu neuronů v žádné části mozku (ve všech případech: LMM: $p>0,05$). Různé výsledky v kognitivních úlohách tedy nelze vysvětlit pomocí vyššího či nižšího počtu neuronů v některé části mozku ani celkovým počtem neuronů.

Tabulka 4. Počet neuronů v jednotlivých částech mozku dospělých gekonů otestovaných v druhé kognitivní úloze

ID gekona	Inkubační teplota	Koncový mozek	Mezimozek	Optické tectum	Mozeček	Mozkový kmen	Čichové laloky	Celkový počet
1	30°	952 320	351 034	554 400	1 252 800	428 040	839 160	4 377 754
115		1 949 060	657 972	671 232	1 063 218	951 549	781 312	6 074 343
131		1 414 224	541 856	892 308	1 101 088	591 315	866 398	5 407 189
135		1 278 720	512 044	692 010	960 228	701 400	660 490	4 804 892
139		1 153 716	564 322	1 016 600	1 313 964	910 584	950 040	5 909 226
37		1 394 160	538 836	624 960	983 560	936 258	647 101	5 124 875
41		1 051 690	413 168	664 962	830 810	483 272	682 816	4 126 718
7		1 301 900	476 064	792 528	935 150	645 540	1 117 776	5 268 958
71		1 752 730	623 710	569 177	1 243 212	946 242	826 440	5 961 511
75		1 493 160	658 680	654 454	1 074 700	502 228	677 700	5 060 922
93		1 545 460	501 188	912 030	1 162 744	680 243	709 733	5 511 398
107		1 253 952	426 932	895 142	661 780	742 739	532 886	4 513 431
125		1 495 656	457 181	1 118 568	727 690	701 135	688 889	5 189 119
118	24°	1 522 248	500 416	586 697	630 896	778 360	705 663	4 724 280
140		1 344 960	588 072	853 800	962 093	851 865	571 704	5 172 494
44		1 866 240	609 560	595 962	972 020	796 668	768 614	5 609 064
23		1 147 376	411 226	776 239	365 334	585 217	685 690	3 971 082
110		1 049 214	500 705	1 109 525	765 393	848 377	695 718	4 968 932
112		1 378 304	593 034	1 024 520	809 709	794 400	579 452	5 179 419

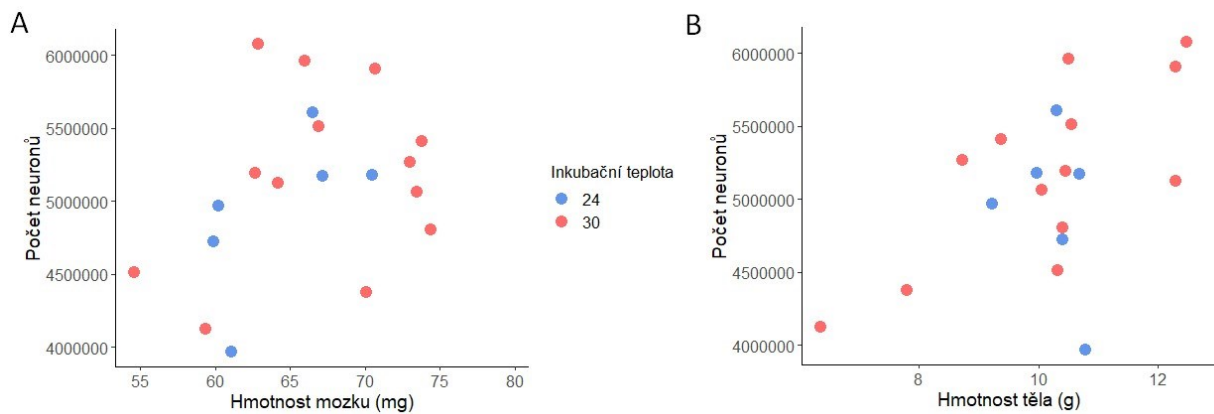
Tabulka 5: Počet gliových buněk v jednotlivých částech mozku dospělých gekonů otestovaných v druhé kognitivní úloze

ID gekona	Inkubační teplota	Koncový mozek	Mezimozek	Optické tectum	Mozeček	Mozkový kmen	Čichové laloky	Celkový počet
1	30°	1 527 680	699 966	765 600	907 200	1 047 960	1 158 840	6 107 246
115		2 162 880	834 028	432 768	838 782	1 319 451	744 688	6 332 597
131		1 483 776	606 144	510 692	709 912	905 685	551 602	4 767 811
135		1 089 280	605 956	472 990	608 772	968 600	624 510	4 370 108
139		1 280 284	678 678	547 400	833 036	1 022 716	789 960	5 152 074
37		1 745 840	543 164	495 040	851 440	1 392 742	535 899	5 564 125
41		1 458 310	640 832	418 038	824 190	1 060 728	821 184	5 223 282
7		1 468 100	549 936	461 472	649 850	1 094 460	634 224	4 858 042
71		1 677 270	662 290	249 783	720 788	1 000 758	593 560	4 904 449
75		1 752 840	838 320	316 546	879 300	716 772	828 300	5 332 078
93		1 608 540	669 812	501 970	828 256	890 757	701 267	5 200 602
107		1 190 398	505 235	860 038	499 238	1 181 455	1 118 172	5 354 536
125		1 495 656	593 809	843 832	442 230	1 302 108	722 769	5 400 404
118	24°	1 675 752	616 584	272 303	573 104	990 640	755 337	4 883 720
140		1 457 040	695 928	569 200	676 907	1 143 135	576 296	5 118 506
44		2 021 760	634 440	283 038	861 980	1 225 332	750 386	5 776 936
23		1 147 376	673 804	682 856	325 279	1 018 116	598 374	4 445 805
110		930 436	477 237	944 781	360 185	1 283 223	642 201	4 638 063
112		1 457 712	612 326	798 469	413 416	1 226 973	528 486	5 037 382

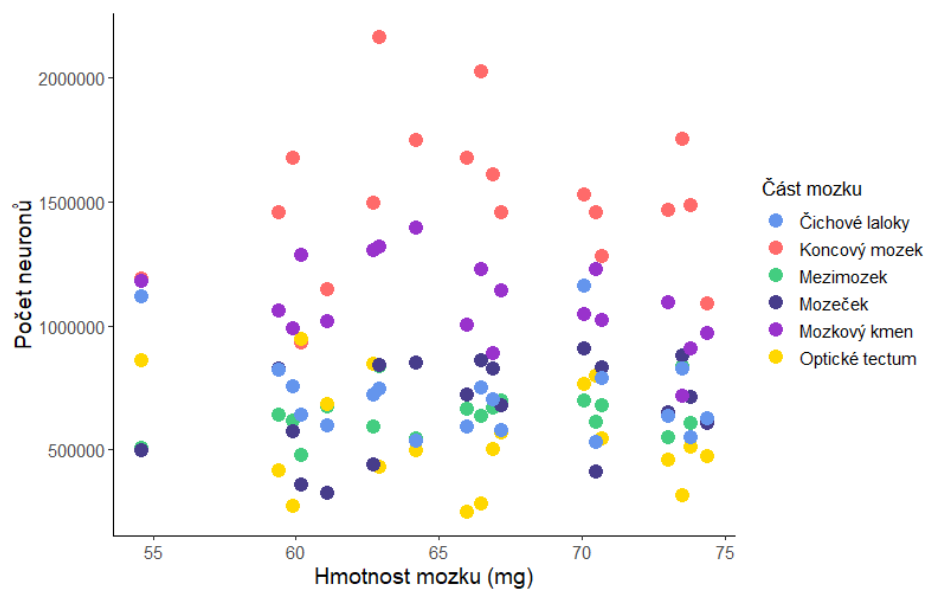


Obrázek 10. (A) Počet neuronů v celém mozku u dospělých gekonů z různých inkubačních teplot ($p=0,695$); (B) Počet neuronů v koncovém mozku u dospělých gekonů z různých inkubačních teplot ($p=0,894$).

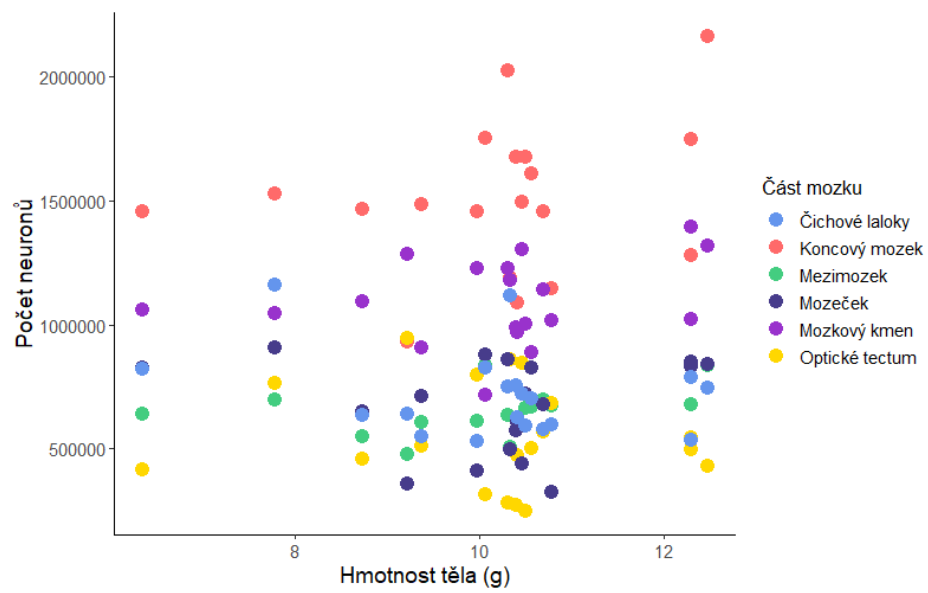
Podobně jako u mláďat, ani u dospělců nekorelovala hmotnost mozku s velikostí těla ($n=23$, LMM: $p=0,352$) a pohlaví neovlivnilo velikost mozku ($n=23$, LMM: $p=0,0678$) či velikost těla (LMM: $p=0,904$). Na rozdíl od mláďat však u dospělců počet neuronů v celém mozku koreloval s hmotností mozku ($n=23$, LMM: $p=0,0295$), hmotností těla (LMM: $p=0,0069$) i délkou těla (LMM: $p=0,0109$). Hmotnost těla ovlivnila počet neuronů zejména v koncovém mozku (LMM: $p=0,0192$), mezimozku (LMM: $p=0,0231$) a mozkovém kmeni (LMM: $p=0,011$).



Obrázek 11. (A) Vztah mezi počtem neuronů a hmotností mozku u dospělých gekonů ($p=0,0295$); (B) vztah mezi počtem neuronů a hmotností těla u dospělých gekonů ($p=0,0069$).



Obrázek 12. Vztah mezi počtem neuronů v jednotlivých částech mozku a hmotností mozku.



Obrázek 13. Vztah mezi počtem neuronů v jednotlivých částech mozku a hmotností těla.

5. DISKUZE

5.1. Inkubace a morfologie

Vajíčka gekonů byla inkubována v teplotách 24°C a 30°C, které spadají do rozmezí teplot, v němž jsou embrya schopna se vyvinout, což je u druhu *Paroedura picta* mezi 22 a 32 °C (Blumberg et al., 2002). Délka inkubace se mezi testovanými teplotami lišila až dvojnásobně, což odpovídá výsledkům předchozích studií na tomto druhu při stejných teplotách (Kratochvíl et al., 2018), při teplotě 28°C trvala 60 dní (Noro et al., 2009). Průměrná délka inkubace byla v mém experimentu při teplotě 30°C 49 dní, při 24°C se prodloužila na průměrných 100 dní. Zvyšující se délka inkubace a vývoje zárodku se snižující se inkubační teplotou je u plazů obecným jevem (Ferguson & Deeming, 1991). Ačkoli inkubační teplota může u některých druhů ovlivnit úspěšnost vylíhnutí a přežívání mláďat (viz např. Dayananda et al., 2017; Demuth, 2001), v našem případě byla u mláďat z nižší inkubační teploty líhivost nižší a mortalita po vylíhnutí vyšší, než je běžné ve srovnatelných experimentech se stejným druhem. Mnoho vylíhnutých mláďat zemřelo během prvních dvou týdnů od vylíhnutí, tudíž nebyla testována v kognitivních úlohách, což zapříčinilo rozdílný počet testovaných gekonů z nižší a vyšší inkubační teploty. Mortalita experimentálních zvířat po druhém testování, mezi 16 dny a půl rokem, již byla velmi nízká, zemřeli pouze dva gekoni z „teplé“ skupiny. Výsledky tedy nebyly zkresleny zařazením neprospívajících mláďat.

Mláďata gekonů z nižší inkubační teploty měla menší hmotnost těla než gekoni z vyšší inkubační teploty, avšak, v rozporu se studiemi provedenými na jiných druzích (viz např. Amiel et al., 2014; Downes et al., 1999), nebyl tento efekt signifikantní. Mláďata se nelišila v délce těla, gekoni z vyšší inkubační teploty však měli mohutnější postavu. Rozdíly ve velikosti těl ovšem nepřetrvávaly do dospělosti, půlroční gekoni z různých inkubačních teplot se již v hmotnosti těla nelišili, podobně jako ve studii se scinky druhu *Bassiana duperreyi*, kde rozdíly ve velikosti těla u jedinců z různých inkubačních teplot vymizely již po šesti týdnech (Elphick & Shine, 2006). Mláďata ve vyšší inkubační teplotě pravděpodobně dokázala efektivněji metabolizovat žloutek. Tento fenomén byl popsán u karety obrovské (*Chelonia mydas*), kde jedinci z prostřední teploty dokázali vstřebat větší množství žloutku během inkubace, než jedinci z nižší a vyšší teploty (Booth et al., 2004). Jelikož se dospělci svou hmotností ani délkou těla nelišili, inkubační teplota neměla vliv na pozdější vývoj a růst, který již probíhal ve stejných podmínkách.

Překvapivě se mezi sebou nelišila pohlaví v hmotnosti ani délce těla, přestože je u tohoto druhu známý sexuální dimorfismus ve velikosti těla, při kterém jsou samci větší než

samice (Starostová et al., 2010). Vzhledem k tomu, že v experimentu byl nevyvážený poměr pohlaví, mohl být rozdíl mezi pohlavími zastřen variabilitou velikosti u samic, kterých bylo větší množství než samců, a tudíž rozdíly mezi pohlavími nemůžeme vyloučit.

5.2. Kognitivní úlohy

V první kognitivní úloze, ve které se měli gekoni naučit pozici otevřeného úkrytu v bludišti tvaru Y, jsme nezaznamenali signifikantní rozdíl v úspěšnosti či míře zlepšení (tj. učení) mezi jedinci z různých inkubačních teplot. Obecně lze konstatovat, že se gekoni příliš během testování nezlepšovali. Úspěšnost v pokusech, která byla hodnocena jako: 1 – gekon si zvolil správné rameno, 0 – gekon si zvolil špatné rameno, byla u všech gekonů v prvním pokusu průměrně 0,49, v posledním pokusu 0,59 (zlepšení o 20,41%). V podobných úlohách zaměřených na srovnání prostorové orientace jedinců z různých inkubačních teplot byl u jiných druhů nalezen signifikantní rozdíl, například u scinků druhu *Bassiana duperreyi* se jedinci z vyšší teploty učili rychleji (Amiel et al., 2014). V tomto pokusu byl výrazný rozdíl mezi úspěšností v prvním a posledním pokusu, v případě scinků z vyšší teploty až pětinasobný a více než dvojnásobný v případě scinků z nižší teploty. Scinkové byli testováni 15 dní, každý den byl proveden jeden pokus. V tomto experimentu ale měli k dispozici také vizuální informaci, jelikož ramena bludiště se lišila barvou a vzorem. Je pravděpodobné, že větší počet zrakových vodítek při prostorové orientaci napomáhá k efektivnímu učení, tj. úloha je snazší než naše úloha, ve které byla k dispozici pouze poziční informace. Scinkové inkubovaní ve vyšší teplotě dosáhli lepších výsledků také v experimentu, ve kterém byly úkryty umístěny v jejich domovském teráriu (Amiel & Shine, 2012). V tomto experimentu patrně hrál významnou roli fakt, že testy byly prováděny ve stejných nádobách, ve kterých byli scinkové chováni, proces učení tudíž neovlivňovalo to, jak se různí jedinci chovají v novém prostředí. Vzhledem k prostorovým omezením takové provedení v mém experimentu nebylo možné.

Mláďata z různých inkubačních teplot se signifikantně lišila v čase potřebném k dokončení úlohy, gekoni z nižší inkubační teploty potřebovali průměrně více času a v bludišti se pohybovali pomaleji než gekoni z vyšší inkubační teploty. Při preferenčním testu, který předcházel samotnému učení, se měřila i rychlost, za kterou gekon proběhne bludištěm. Tato rychlost byla signifikantně ovlivněna inkubační teplotou a nekorelovala s hmotností či délkou těla, naopak korelovala s celkovým časem ve všech pokusech první kognitivní úlohy. Inkubační teplota může ovlivňovat rychlost pohybu, jak bylo demonstrováno například při pokusu s leguánky druhu *Sceloporus virgatus* (Qualls & Andrews, 1999), se scinky druhu *Bassiana*

duperreyi (Elphick & Shine, 2006) nebo s kožnatkami hladkými (*Apalone mutica*) (Ashmore & Janzen, 2003). Ve všech těchto případech byli jedinci z vyšší inkubační teploty rychlejší, u leguánků byla mláďata z nižší teploty navíc méně aktivní v novém prostředí. V mnoha kognitivních úlohách závisí úspěšnost právě na pohybu v bludišti či aréně, a proto jedinci, kteří se v bludišti budou chovat spíše pasivně, budou pravděpodobněji dosahovat horších výsledků, než jedinci pohybující se aktivně. Inkubační teplota v mém experimentu tedy neovlivnila samotnou schopnost učení, ale spíše rychlost pohybu a aktivitu v bludišti. Rychlejší gekoni byli rovněž více aktivní v bludišti, méně se zastavovali a silněji reagovali na simulovaný útok predátora, který je motivoval k hledání úkrytu. Zlepšení během testování, rozdíl mezi časem v prvních třech a posledních třech pokusech, nejvíce záviselo na přírůstku hmotnosti od vylíhnutí po první den testování, dále korelovalo i s rychlostí pohybu. Přírůstek hmotnosti by mohl být jedním z ukazatelů kvality a zdatnosti mláďete, která se projeví pozitivně na výsledcích v kognitivních úlohách.

Druhou kognitivní úlohou, ve které byli testováni půlroční gekoni, byla aréna s čtyřmi úkryty a správný úkryt byl odlišen od ostatních barvou, v této úloze tudíž nehrála roli poziční informace, jako tomu bylo v první úloze (pozice otevřeného úkrytu se měnila při každém pokusu), ale gekoni se měli učit podle barvy. Plazi jsou schopni dobře rozlišovat barvy, jsou trichromatičtí případně tetrachromatičtí, tj. mají tři nebo čtyři druhy čípků s maximální citlivostí k různým vlnovým délkám světla; mnoho druhů má i přesah do UV spektra (Font, 2020). Plazi jsou tedy schopni barvy rozlišovat a použít je jako vodítko k učení (např. Arnold & Neumeyer, 1987; Gaalema, 2011; Young et al., 2012). Scinkové druhu *Bassiana duperreyi* (Clark et al., 2014) a anolisové druhu *Anolis evermanni* (Leal & Powell, 2012) se naučili rozlišovat mezi různě barevnými víčky, která taktéž mezi jednotlivými pokusy měnila svoje umístění. V druhé mnou provedené kognitivní úloze bylo zlepšení mezi prvním a posledním pokusem patrnější. Zatímco v prvním pokusu udělali gekoni průměrně 5,43 chyb, v posledním pokusu jich udělali průměrně jen 2,91 (zlepšení o 46%). Gekoni z vyšší inkubační teploty udělali v prvním pokusu průměrně 4,81 chyb, v posledním pokusu 2,13 (zlepšení o 55,8%), zatímco gekoni z nižší inkubační teploty udělali v prvním pokusu průměrně 6,86 chyb a v posledním pokusu průměrně 4,71 chyb (zlepšení o 31,34%).

V druhé kognitivní úloze již byly mezi gekony z různých inkubačních teplot patrnější rozdíly v úspěšnosti, ačkoli nebyly signifikantní. Gekoni z vyšší inkubační teploty udělali více správných voleb, tedy ve více pokusech si zvolili ihned správný přístupný úkryt. Nevýhodou první kognitivní úlohy je malé množství možností v bludišti, jelikož si gekon vybírá pouze ze dvou ramen, a tak úspěšnost v úloze a počet správných odpovědí můžou být částečně

ovlivněny tím, že v některých případech si gekon vybere správné rameno náhodně. Výsledky učení z obou úloh nelze proto přímo porovnávat, jelikož šlo o rozdílné úlohy a navíc byli gekoni testováni v různém věku. Pro mláďata a dospělé gekony byla použita odlišná úloha z důvodu přizpůsobení úlohy chování zvířat v různém věku. U druhé úlohy je výhodou větší počet možností v aréně a tím i lepší posouzení výsledků učení, ale pro mláďata, která rychleji reagují na stimulaci útekem a věnují méně pozornosti vizuálním vodítkům, by mohla být příliš složitá.

Rozdíly v čase potřebném k dokončení úlohy byly patrné i v druhé kognitivní úloze, gekoni z inkubační teploty 30°C potřebovali méně času napříč všemi pokusy, než gekoni z inkubační teploty 24°C. Vliv inkubační teploty na pohyb a aktivitu v bludišti či aréně přetrvává do dospělosti, na rozdíl od vlivu na hmotnost těla, který je patrný pouze u mláďat. Vzhledem k tomu, že i jedinci ze studené teploty byli v jednotlivých případech schopní stejně rychlého pohybu, delší doba potřebná k dokončení úlohy nepramení z toho, že by byla narušena motorika, jak tomu bylo například u scinků druhu *Eumeces elegans*, kde jedinci inkubovaní v příliš vysoké teplotě měli omezenou schopnost pohybu (Du et al., 2003).

Rozdíly v pohybu a tedy i celkovém čase vycházely spíše z motivace se pohybovat v bludišti či aréně. Někteří jedinci byli více pasivní, sami se málo pohybovali a častěji se zastavovali, a to i přes to, že při pokusech byl použit simulovaný útok predátora, který měl gekona podnítit k pohybu a nalezení úkrytu za pomoci štětce. Výsledky testování mohou být ovlivněny individuálními rozdíly v chování. Takovéto dlouhodobě neměnné (tj. opakovatelné) individuální charakteristiky jsou označovány jako personalita nebo behaviorální syndrom (Carere & Locurto, 2011). Při studiu personality se zkoumá především pět kategorií: „shyness-boldness“, která se hodnotí podle reakce na riskantní či stresové situace, „exploration-avoidance“, která hodnotí, jak se jedinec chová při vystavení novému podnětu, aktivita, socialita a agrese vůči jedincům stejného druhu (Réale et al., 2007 ; Waters et al., 2017). Personalita či behaviorální syndrom byly úspěšně demonstrovány u několika druhů plazů, studie byly nejčastěji zaměřeny na kategorii „shyness-boldness“. U scinků druhu *Lampropholis delicata* byly pozorované opakovatelné rozdíly v exploraci, aktivitě i míře riskantního chování (Michelangeli et al., 2019). Samci agamy ostnitě (*Agama planiceps*) se lišili v reakci na potenciálního predátora (Carter et al., 2010). U ještěrky *Iberolacerta monticola* byly pozorovány konzistentní rozdíly v antipredačním chování (López et al., 2005). U ještěrek živorodých (*Zootoca vivipara*) byly studovány různé kategorie personality, aktivita, agrese, riskantní chování a socialita, avšak pouze rozdíly v prvních třech kategoriích byly opakovatelné (Mell et al., 2016), ale u samců tohoto druhu byly v jiném experimentu pozorovány opakovatelné rozdíly i v socialitě (Teyssier et al., 2014). Juvenilové i dospělci ještěrky zelené

(*Lacerta viridis*) se lišili mírou exploračního i riskantního chování (Bajer et al., 2015) a mezi scinky druhu *Egernia whitii* byly zjištěny opakovatelné rozdíly v chování v přítomnosti potenciálního predátora, naopak rozdíly v agresi či exploraci opakovatelné nebyly (McEvoy et al., 2015). Ve zmíněných studiích bylo chování testováno v rámci několika týdnů, tudíž není jisté, zda tyto rozdíly přetrvávají po celý život jedince. Například v experimentu s agamou vousatou (*Pogona vitticeps*) se jedinci z odlišné inkubační teploty lišili v reakci na nový objekt. Tyto rozdíly ovšem nebyly dlouhodobé a opakovatelné, jelikož po pěti měsících byly výsledky v tomto testu odlišné než v první fázi testování (Siviter et al., 2017b).

Především první dvě kategorie personality, tedy to, jak je jedinec ochoten riskovat a jak se chová v novém prostředí, může ovlivnit kognitivní testy, záleží ale na typu úlohy, přičemž v různých úlohách mohou být zvýhodněni jedinci s různým typem personality (Carere & Locurto, 2011). Například scinkové druhu *Eulamprus quoyii* lišící se v kategorii „boldness-shyness“ dosáhli různých výsledků v úloze zaměřené na prostorovou orientaci (Carazo et al., 2014). Nejhorších výsledků dosahovali v tomto pokusu jedinci, jejichž personalita se nezařadila ani do jedné kategorie „shy“, nebo „bold“. V experimentu zaměřeném na stejnou kategorii personality trávily agamy vousaté (*Pogona vitticeps*) inkubované v nižší teplotě kratší dobu v blízkosti nového objektu (Siviter et al., 2017b). U gekončků druhu *Coleonyx elegans* ovlivnila inkubační teplota chování v open-field testu, ve kterém se používá aréna, jejíž plocha je rozdělena na stejnoměrné čtverce. Chování v tomto testu může být do značné míry ovlivněno personalitou zvířat, jelikož se v něm hodnotí aktivita zvířete a počet vnitřních a vnějších čtverců, které testovaný subjekt navštíví za vyměřený čas. V tomto experimentu byli jedinci inkubovaní v nejvyšší teplotě méně aktivní. Tato inkubační teplota sice byla vyšší než optimum pro daný druh, ale jedinci z nejvyšší teploty byli méně aktivní než jedinci z nejnižší teploty, která byla od optima stejně vzdálená. Jedinci z nejnižší teploty a optimální teploty se v tomto testu příliš nelišili (Trnik et al., 2016). Inkubační teplota tedy nemusí ovlivňovat přímo kognitivní schopnosti, její vliv může působit skrz personalitu, která může značně ovlivnit, jak se bude jedinec chovat při pokusu. Výsledek kognitivní úlohy může být zkreslený, pokud se zvíře například nebude aktivně pohybovat a bude se vyhýbat neznámým objektům, protože obojí může být pro dokončení úlohy nezbytné.

V mém experimentu nebylo cílem zjišťovat personalitu u gekonů druhu *Paroedura picta*. Samotná rychlost pohybu byla měřena pouze u mláďat, proto nelze s jistotou říci, zda rozdíly přetrvávaly do dospělosti. Rozdíl mezi skupinami v celkovém čase v první úloze do dospělosti přetrvával, gekoni z nižší inkubační teploty potřebovali signifikantně více času v obou úlohách než gekoni z vyšší inkubační teploty. Celkový čas v druhé kognitivní úloze ovšem

nekoreloval s celkovým časem v první úloze, tudíž nízký čas potřebný v první úloze nepredikoval nízký čas v druhé úloze. Nelze tedy jednoznačně říct, zda v tomto případě šlo o personalitu, ale skupiny s různou inkubační teplotou se mezi sebou lišily v pohybu v bludišti či aréně, což se projevilo na výsledcích v kognitivních úlohách.

Mechanismy stojící za rozdílnou personalitu nejsou příliš známy. Zdá se, že částečně by mohla být personalita dědičná (Waters et al., 2017). Personalita také souvisí s metabolickou rychlostí a energií. Předpokládá se, že klidová rychlost metabolismu bude vzrůstat s vyšší mírou aktivity a agrese u jedince. Zároveň u jedinců z kategorie „shy“ může trvat déle, než se rychlost metabolismu vrátí na klidovou hodnotu po vystavení stresovému stimulu. Jednou z možností vysvětlující, jak spolu souvisí personalita a metabolismus, je hypotalamo-pituitárně-adrenální (HPA) osa, která se zapojuje do regulace energie a metabolismu a rovněž do stresových reakcí (Careau et al., 2008). Glukokortikoidy by mohly být jedním z důležitých mechanismů ovlivňujících personalitu, jelikož jsou uvolňovány při stresových situacích, u kterých je současně zvýšena aktivita HPA osy. To vede k různým fyziologickým změnám, které mohou ovlivňovat metabolismus, a rovněž mohou mít vliv i na chování a některé typy chování mohou být závislé na hladině glukokortikoidů (Carere et al., 2010). Výzkum zabývající se mechanismy personality, případně hormony s ní souvisejícími, se provádí především u ptáků a savců, tudíž není zcela jisté, jak podobný mechanismus funguje u plazů či ostatních ektotermních živočichů. Lze ale předpokládat, že základní mechanismy budou podobné.

Možnému vztahu inkubační teploty a metabolismu odpovídají výsledky některých studií, při kterých inkubační teplota ovlivnila například mitochondriální respiraci (Sun et al., 2015) či expresi genů souvisejících s metabolickými drahami (Pallotta et al., 2017) nebo i velikost hypotalamu, který se na řízení metabolismu podílí (Coomber et al., 1997). Inkubační teplota tedy může ovlivňovat metabolismus a jeho prostřednictvím i personalitu, která následně může ovlivnit výsledky v kognitivních úlohách.

Vliv inkubační teploty na personalitu může být také zprostředkován vlivem na tvorbu a/nebo regulaci hormonů. Na vzniku dlouhodobých rozdílů v chování mezi jedinci stejného druhu se nejspíše podílejí především kortizol a další glukokortikoidy a testosteron. Steroidní hormony ovlivňují některé funkce související s energetickou bilancí a rozmnožováním, glukokortikoidy například souvisí s odpovědí na stresové podmínky (Wilson et al., 2019). Kupříkladu u několika druhů ptáků bylo zjištěno, že hladina kortikosteronu a personalita spolu souvisí. Ptáci s tzv. proaktivní personalitou, což je typ personality, při kterém jsou jedinci odvážnější, aktivnější i agresivnější, měli nižší hladinu kortikosteronu při stresovém stimulu

(Cockrem, 2007). V experimentu se sýkorami koňadrami (*Parus major*) souviselo explorační chování s hladinou kortikosteronu. Jedinci s rychlejší exploraací měli nižší hladinu kortikosteronu při stresové situaci (Stöwe et al., 2010). Gekončici druhu *Coleonyx elegans* inkubovaní v různých teplotách se lišili v chování při stresové situaci (Trnik et al., 2011), a je tedy možné, že i v tomto případě měli jedinci s různým chováním odlišnou hladinu kortikosteronu. U gekonů druhu *Paroedura picta* se vzrůstající hladinou testosteronu rostla i míra agresivního chování (Golinski et al., 2014). Typ personality zřejmě ovlivňuje kombinace několika faktorů. Zvířata s proaktivní a reaktivní personalitou se neliší pouze v reakci na stres a v aktivitě HPA osy, která se na stresových reakcích podílí, ale rovněž se mohou lišit i v reaktivitě sympatiku a parasympatiku a hladinou testosteronu (Koolhaas et al., 1999). Jelikož produkce těchto hormonů je řízena mozkem, je také možné, že inkubační teplota v tomto případě ovlivnila například aktivitu či stavbu některé jeho části, která je zodpovědná za řízení endokrinních funkcí. Má studie však nebyla koncipována tak, aby umožnila případné regionální strukturní změny ve stavbě mozku odhalit.

5.3. Velikost mozku a počet neuronů

Odhad počtu neuronů byl proveden u reprezentativního vzorku gekonů inkubovaných při dvou různých teplotách a v odlišném stáří, aby bylo možné zjistit, zda inkubační teplota ovlivňuje počet neuronů a nonneurálních buněk u mláďat a/nebo u dospělců a zároveň testovat, jestli počet neuronů koreluje s úspěšností v kognitivních úlohách.

Jako možný prediktor funkční kapacity byla dlouho používána velikost mozku.

Absolutní velikost mozku je velmi závislá na velikosti těla, proto se častěji používala relativní velikost mozku (viz např. Jerison 1973), ovšem podle některých názorů není dobrým korelátem kognitivních schopností ani absolutní ani relativní velikost mozku (Healy & Rowe, 2007).

Mnohem lépe s kognitivními schopnostmi koreluje počet neuronů, a to zejména v koncovém mozku, který je jedním z hlavních faktorů určujících procesní kapacitu mozku (Dicke et al., 2016, Herculano-Houzel 2017, Němec & Osten 2020). Přestože je velikost mozku, a to jak absolutní, tak relativní, jako možný ukazatel kognitivních schopností kritizována, v druhé kognitivní úloze měla absolutní velikost mozku pozitivní vliv na celkový počet správných voleb během testování. Korelace absolutní velikosti mozku s kognitivními schopnostmi, především v doméně kontroly exekutivního chování, byla opakovaně prokázána na mezidruhové (Deaner et al. 2007, MacLean et al. 2014) i vnitrodruhové úrovni (Kotrschal et al. 2015; Buechel et al. 2018; Horschler et al. 2019, viz níže). Velké množství srovnávacích studií demonstrovalo

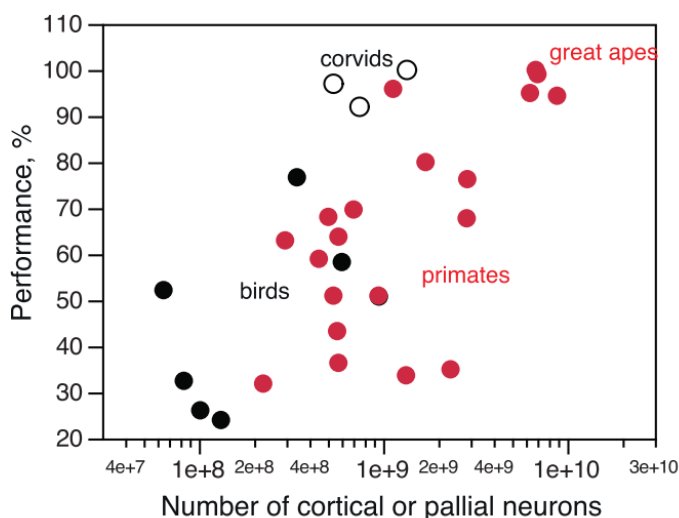
korelaci mezi kognitivními schopnostmi a relativní velikostí mozku (viz např. Benson-Amram et al., 2016; Bundsen, 2012).

Velikost mozku ovlivnila chování a/nebo úspěšnost v několika úlohách u myši, které byly testovány v open-field aréně, kde bylo pozorováno, jak se jedinec bude chovat v přítomnosti nového objektu, v osmiramenném bludišti, kde se měly naučit, ve kterém rameni se ukrývá odměna, a nakonec v aréně, ve které musely překonat bariéru ve formě nakloněné roviny, aby se dostaly k potravě. Jedinci s větším mozkem dosahovali lepších výsledků (Anderson, 1993). Vliv velikosti mozku na učení byl prokázán i u živorodek duhových (*Poecilia reticulata*) v úloze zaměřené na asociaci vizuálního stimulu s odměnou a numerické schopnosti. Rybám byly prezentovány kartičky s dvěma a čtyřmi obrázky a za výběr správné kartičky byly odměněny potravou. Výrazný rozdíl byl pozorován pouze u samic, samice s relativně větším mozkem byly úspěšnější, dokázaly lépe rozlišovat mezi dvěma a čtyřmi obrázky a měly více správných odpovědí než samice s menšími mozky. U samců nebyl výrazný rozdíl pozorován. V tomto experimentu nebyly porovnávány relativní velikosti mozků u jedinců, nýbrž byly porovnávány dvě skupiny lišící se relativní velikostí mozku. Skupiny s velkou a malou relativní velikostí mozku byly získány umělým výběrem a lišily se relativní velikostí mozku o 9 % (Bundsen, 2012). Samice stejného druhu, které opět pocházely z linií s velkou a malou velikostí mozku, se lišily i ve schopnosti reverzního učení (Buechel et al., 2018). V jiné úloze zaměřené na prostorovou orientaci u samců, se rovněž jedinci ze skupiny s větší relativní velikostí mozku rychleji učili najít samici v bludišti (Kotrschal et al., 2015). Navíc u těchto dvou linií živorodek byla zjištěna rozdílná personalita. Skupiny se mezi sebou lišily chováním v open-field testu. Jedinci ze skupiny s větší velikostí mozku se rychleji habituovali a byla u nich vyšší míra exploračního chování. Zároveň u nich byla zjištěna nižší hladina kortizolu při stresové reakci a v pokusu s novým typem potravy vykazovali menší behaviorální flexibilitu, jelikož jedinci ze skupiny s menší velikostí mozku začali nový typ potravy rychleji konzumovat. Tyto výsledky ukazují, že jedinci ze skupiny s většími mozky spíše spadali do kategorie personality „bold“ (Kotrschal et al., 2014).

Je třeba podotknout, že ačkoli ve všech výše uvedených experimentech byla jako korelát použita relativní velikost mozku, zvířata se zároveň lišila i jeho absolutní hmotností a počtem neuronů. Studie kvantifikující počet neuronů u samic ze skupin s malou a velkou velikostí mozku ukázala, že obě skupiny měly srovnatelnou hustotu neuronů a samice ze skupiny s větší velikostí mozku měly tedy i více neuronů, navíc počet neuronů vzrůstal lineárně s velikostí mozku (Marhounová et al., 2019). Jelikož samice s větší velikostí mozku a tedy i s větším počtem neuronů byly úspěšnější v předchozích testech kognitivních schopností,

podporují tyto výsledky názor, že počet neuronů ovlivňuje kognitivní schopnosti. Vzhledem k tomu, že s rostoucí velikostí mozku roste i počet neuronů, nelze oddělit vliv velikosti mozku a vliv počtu neuronů na výsledky v kognitivních úlohách.

Velikost mozku může hrát roli i při mezidruhovém srovnávání kognitivních schopností, jak ukazuje studie zaměřená na šelmy (Benson-Amram et al., 2016). V tomto experimentu bylo testováno 140 jedinců z 39 druhů šelem, přičemž u každého druhu bylo průměrně otestováno pět jedinců. Předmětem úlohy bylo inovativní řešení problému, při testování musel jedinec odstrčit zástrčku blokující dvířka kovového boxu, který ukrýval potravu. Druhy s větší relativní velikostí mozku byly v této úloze úspěšnější, avšak není vyloučeno, že druhy s větší relativní velikostí mozku a lepšími výsledky v kognitivní úloze měly rovněž i větší počet neuronů. Při mezidruhovém srovnání počet neuronů v kůře savců a ptáků souvisel s úspěšností v kognitivních úlohách (Herculano-Houzel, 2017). Několik druhů ptáků a savců bylo testováno ve dvou úlohách. V první nazvané „A-not-B“ bylo zvířatům ukázáno, jak se odměna ve formě potravy ukrývá do či pod jednu ze tří nádob, následně je vyjmuta a přenesena do jiné, poté byl zvířeti umožněn přístup k nádobám a sledovalo se, kterou nádobu si vybere. V druhé úloze byla odměna umístěna do průhledného válce a sledovalo se, zda zvíře dokáže potravu získat (MacLean et al., 2014). Úspěch v této úloze závisel na tom, zda zvíře vsunulo končetinu či hlavu přímo do válce (úspěšná strategie), či zda se snažilo potravu získat přes průhlednou stěnu válce (neúspěšná strategie). Výsledky jednotlivých druhů korelovaly s daty o počtu neuronů u těchto druhů (Herculano-Houzel, et al., 2015; Olkowitz et al., 2016). Počet neuronů by nemusel ovšem přímo souviset s úrovní kognitivních schopností, tedy zda se dokáže zvíře danou úlohu naučit, ale spíše s rychlostí učení a behaviorální flexibilitou při testování (Güntürkün et al., 2017).



Obrázek 14. Vztah mezi výsledky v kognitivních úlohách (MacLean et al., 2014) a počtem kortikálních neuronů u primátů (červeně) a palliálních neuronů ptáků (černě) (Herculano-Houzel et al., 2015; Olkowitz et al., 2016), převzato z (Herculano-Houzel, 2017)

Počet neuronů neodpovídal výsledkům v kognitivních a behaviorálních úlohách u myší (Neves et al., 2020), které byly testovány v několika úlohách prověřující různé kognitivní schopnosti. Předpokládalo se, že úspěšnost v úlohách bude ovlivněna počtem neuronů v částech mozku, které souvisí se schopnostmi testovanými v úloze, například jedinci úspěšnější v olfaktorickém testu budou mít více neuronů v čichových lalocích. Odhad počtu neuronů byl proveden v pěti částech mozku: cerebrální kortex, hippocampus, mozeček, čichové laloky a zbytek mozku. Ačkoli úlohy testovaly různé schopnosti myší, jako je olfaktorická navigace, pohyb, navigace v bludišti, paměť, schopnost řešení problémů a flexibilitu v učení, počet neuronů jen málo koreloval s úspěšností v úlohách (Neves et al., 2020). U myší byla rovněž zjištěna značná vnitrodruhová variabilita v počtu neuronů, která byla zkoumána na 19 jedincích stejného věku a pohlaví. Jedinci se mezi sebou lišili v počtu neuronů 1,63x, v počtu gliových buněk 2,98x a v hmotnosti mozku 1,33x. Zároveň hmotnost mozku nekorelovala s počtem neuronů ani s velikostí těla, jedinci s většími mozky tedy nemusejí mít více neuronů než jedinci s mozky menšími; zvyšující se počet neuronů tak u myší souvisel primárně se zvyšováním neuronální hustoty (Herculano-Houzel et al., 2015).

Podobná vnitrodruhová variabilita je i u gekonů *Paroedura picta*, kteří se lišili v počtu neuronů 1,71x, v počtu nonneurálních buněk 2,28x a v hmotnosti mozku 1,66x. Počet neuronů koreloval s hmotností mozku, ale nekoreloval s hmotností těla. Zároveň u tohoto druhu byla objevena velká mezipopulační variabilita (Kverková et al., v revizi). V mé studii se mláďata v celkovém počtu neuronů lišila 1,67x, v celkovém počtu nonneurálních buněk 1,78x a v hmotnosti mozku 1,48x. Dospělci se lišili v celkovém počtu neuronů 1,53x, v celkovém počtu nonneurálních buněk 1,45x, v hmotnosti mozku 1,46x. Na rozdíl od předchozí studie počet neuronů koreloval s hmotností a délkou těla. Efekt matky na počet neuronů či výsledky v kognitivních úlohách jsme nemohli zhodnotit díky nerovnoměrnému počtu potomků u jednotlivých samic, jelikož od některých samic byli zahrnuti do testu pouze jeden či dva potomci a naopak od některých samic bylo zahrnuto více než osm potomků. Avšak ID matky bylo přidáno do statistických testů jako náhodný efekt, abychom odfiltrovali vliv vzájemné příbuznosti testovaných zvířat. Protože přidání náhodného efektu matky do modelu při analýze dat změnilo některé výsledky, je vliv matky na některé výsledky potomků pravděpodobný.

Rozdílné výsledky studií by mohly poukazovat na to, že u různých druhů či skupin zvířat je vztah mezi kognitivními schopnostmi, velikostí mozku a počtem neuronů různě silný či je tento vliv hůře či lépe detekovatelný. Velikost mozku by mohla být důležitým faktorem spíše u vnitrodruhových studií, naproti tomu u mezidruhových studií by mohlo být lepší možností použít počet neuronů, který je dobrým, ale nikoli jediným ukazatelem procesní kapacity

mozku. Vliv počtu neuronů na kognitivní schopnosti by mohl být patrný až při větších rozdílech, než jaké jsou obvyklé na vnitrodruhové úrovni. U dospělých gekonů ovlivnila velikost mozku výsledky v kognitivní úloze, naopak počet neuronů vliv na výsledky neměl. Počet neuronů v celém mozku ale koreloval s hmotností a délkou těla. Inkubační teplota neovlivnila počet neuronů v celém mozku či jeho částí, vyjma mozečku, ovšem počet neuronů v mozečku nekoreloval s žádným výsledkem v kognitivních úlohách, jako jsou celkový čas, úspěšnost či počet chyb. Inkubační teplota ovlivnila nejspíše chování při testování a tyto rozdíly mezi skupinami by mohly značit rozdílnou personalitu zvířat inkubovaných v různých teplotách. Velikost mozku by také mohla částečně ovlivnit personalitu, podobně jako tomu bylo v případě živorodek (Kotrschal et al, 2014), kde jedinci s větší relativní velikostí mozku spadali spíše do kategorie „bold“ a lišili se i v míře explorační. Vliv velikosti mozku na celkový čas potřebný v k úspěšnému vyřešení úlohy se pohyboval blízko hranice statistické významnosti (LMM: $p=0,055$), což by mohlo značit, že v případě dospělých gekonů velikost mozku taktéž ovlivnila chování v aréně.

6. SOUHRN

Vliv inkubační teploty na kognitivní schopnosti a buněčné složení mozku byl zkoumán na modelu gekona druhu *Paroedura picta*. Gekoni inkubovaní v nižší teplotě měli delší délku inkubace a menší velikost těla po vylíhnutí, mezi gekony z rozdílných teplot nebyl rozdíl v hmotnosti mozku či délce těla. V první kognitivní úloze inkubační teplota neovlivnila počet správných voleb, v druhé kognitivní úloze již byly rozdíly patrnější, ačkoli rozdíl mezi skupinami v úspěšnosti nebyl signifikantní. U mláďat i dospělých gekonů byl signifikantní rozdíl v celkovém čase potřebném na zvládnutí testů, gekoni z nižší inkubační teploty potřebovali průměrně více času a tento rozdíl byl patrný i po šesti měsících. Rozdíl v potřebném čase ve všech pokusech nebyl zapříčiněn zhoršenou schopností pohybu u gekonů ze „studené skupiny“, ale rozlišným chováním a sníženou motivací k pohybu v bludišti i aréně. Inkubační teplota ovlivnila spíše chování a motivaci gekonů, což následně ovlivnilo výsledky v kognitivních úlohách. Počet neuronů a nonneurálních buněk byl stanoven pomocí izotropní frakcionace u reprezentativního vzorku mláďat i dospělých gekonů testovaných v kognitivních úlohách. Mozek mláďat byl rozdělen na dvě části: hemisféry koncového mozku a zbytek mozku, mozek dospělých gekonů byl rozdělen na šest částí: čichové laloky, hemisféry, mezimozek, optické tectum, mozeček a mozkový kmen. Počet neuronů v celém mozku ani v jednotlivých částech nebyl ovlivněn inkubační teplotou, s výjimkou mozečku. Počet neuronů neovlivnil výsledky v kognitivních úlohách. V druhé kognitivní úloze byla ovšem úspěšnost ovlivněna absolutní velikostí mozku. Zdá se pravděpodobné, že inkubační teplota v tomto pokusu ovlivnila výsledky v kognitivních úlohách nepřímo prostřednictvím vlivu na personalitu zvířat, která vyústila v rozdílné chování v bludišti či aréně.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abayarathna, T., & Webb, J. K. (2020). Effects of incubation temperatures on learning abilities of hatchling velvet geckos. *Animal Cognition*, 1-8.
- Amiel, J. J., Bao, S., & Shine, R. (2017). The effects of incubation temperature on the development of the cortical forebrain in a lizard. *Animal cognition*, 20(1), 117-125.
- Amiel, J. J., & Shine, R. (2012). Hotter nests produce smarter young lizards. *Biology Letters*, 8(3), 372-374.
- Amiel, J. J., Lindström, T., & Shine, R. (2014). Egg incubation effects generate positive correlations between size, speed and learning ability in young lizards. *Animal cognition*, 17(2), 337-347.
- Anderson, B. (1993). Evidence from the rat for a general factor that underlies cognitive performance and that relates to brain size: intelligence?. *Neuroscience Letters*, 153(1), 98-102.
- Andrews, R. M., Mathies, T., & Warner, D. A. (2000). Effect of incubation temperature on morphology, growth, and survival of juvenile *Sceloporus undulatus*. *Herpetological Monographs*, 420-431.
- Arnold, K., & Neumeyer, C. (1987). Wavelength discrimination in the turtle *Pseudemys scripta elegans*. *Vision Research*, 27(9), 1501-1511.
- Ashmore, G. M., & Janzen, F. J. (2003). Phenotypic variation in smooth softshell turtles (*Apalone mutica*) from eggs incubated in constant versus fluctuating temperatures. *Oecologia*, 134(2), 182-188.
- Bajer, K., Horváth, G., Molnár, O., Török, J., Garamszegi, L. Z., & Herczeg, G. (2015). European green lizard (*Lacerta viridis*) personalities: Linking behavioural types to ecologically relevant traits at different ontogenetic stages. *Behavioural processes*, 111, 67-74.
- Ballen, C. J., Shine, R., & Olsson, M. M. (2015). Developmental plasticity in an unusual animal: the effects of incubation temperature on behavior in chameleons. *Behaviour*, 152(10), 1307-1324.
- Benson-Amram, S., Dantzer, B., Stricker, G., Swanson, E. M., & Holekamp, K. E. (2016). Brain size predicts problem-solving ability in mammalian carnivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(9), 2532-2537.

- Blumberg, M. S., Lewis, S. J., & Sokoloff, G. (2002). Incubation temperature modulates post-hatching thermoregulatory behavior in the Madagascar ground gecko, *Paroedura pictus*. *Journal of Experimental Biology*, 205(18), 2777-2784.
- Booth, D. T., Burgess, E., McCosker, J., & Lanyon, J. M. (2004). The influence of incubation temperature on post-hatching fitness characteristics of turtles. In *International Congress Series* (Vol. 1275, pp. 226-233). Elsevier.
- Bowden, R. M., Carter, A. W., & Paitz, R. T. (2014). Constancy in an inconstant world: moving beyond constant temperatures in the study of reptilian incubation.
- Brillet, C. (1993). Behavioural cues in sex recognition by two species of nocturnal lizards: *Eublepharis macularius* and *Paroedura pictus*. *Amphibia-Reptilia*, 14(1), 71-82.
- Brown, G. P., & Shine, R. (2006). Effects of nest temperature and moisture on phenotypic traits of hatchling snakes (*Tropidonophis mairii*, *Colubridae*) from tropical Australia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 89(1), 159-168.
- Buechel, S. D., Boussard, A., Kotrschal, A., van der Bijl, W., & Kolm, N. (2018). Brain size affects performance in a reversal-learning test. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1871), 20172031.
- Bundsen, A. (2012). Artificial selection for large and small relative brain size in guppies (*Poecilia reticulata*) results in differences in cognitive ability.
- Burger, J. (1989). Incubation temperature has long-term effects on behaviour of young pine snakes (*Pituophis melanoleucus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 24(4), 201-207.
- Burger, J. (1990). Effects of incubation temperature on behavior of young black racers (*Coluber constrictor*) and kingsnakes (*Lampropeltis getulus*). *Journal of Herpetology*, 158-163.
- Burger, J. (1991). Response to prey chemical cues by hatchling pine snakes (*Pituophis melanoleucus*): effects of incubation temperature and experience. *Journal of chemical ecology*, 17(6), 1069-1078.
- Burger, J. (1998). Antipredator behaviour of hatchling snakes: effects of incubation temperature and simulated predators. *Animal Behaviour*, 56(3), 547-553.
- Carazo, P., Noble, D. W., Chandrasoma, D., & Whiting, M. J. (2014). Sex and boldness explain individual differences in spatial learning in a lizard. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1782), 20133275.

- Careau, V., Thomas, D., Humphries, M. M., & Réale, D. (2008). Energy metabolism and animal personality. *Oikos*, 117(5), 641-653.
- Carere, C., Caramaschi, D., & Fawcett, T. W. (2010). Covariation between personalities and individual differences in coping with stress: converging evidence and hypotheses. *Current Zoology*, 56(6), 728-740.
- Carere, C., & Locurto, C. (2011). Interaction between animal personality and animal cognition. *Current Zoology*, 57(4), 491-498.
- Carter, A. J., Goldizen, A. W., & Tromp, S. A. (2010). Agamas exhibit behavioral syndromes: bolder males bask and feed more but may suffer higher predation. *Behavioral Ecology*, 21(3), 655-661.
- Chittka, L., & Niven, J. (2009). Are bigger brains better?. *Current biology*, 19(21), R995-R1008.
- Clark, B. F., Amiel, J. J., Shine, R., Noble, D. W., & Whiting, M. J. (2014). Colour discrimination and associative learning in hatchling lizards incubated at 'hot' and 'cold' temperatures. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 68(2), 239-247.
- Cockrem, J. F. (2007). Stress, corticosterone responses and avian personalities. *Journal of Ornithology*, 148(2), 169-178.
- Coomber, P., Crews, D., & Gonzalez-Lima, F. (1997). Independent effects of incubation temperature and gonadal sex on the volume and metabolic capacity of brain nuclei in the leopard gecko (*Eublepharis macularius*), a lizard with temperature-dependent sex determination. *Journal of Comparative Neurology*, 380(3), 409-421.
- Davis, K. M., & Burghardt, G. M. (2007). Training and long-term memory of a novel food acquisition task in a turtle (*Pseudemys nelsoni*). *Behavioural processes*, 75(2), 225-230.
- Dayananda, B., Penfold, S., & Webb, J. K. (2017). The effects of incubation temperature on locomotor performance, growth and survival in hatchling velvet geckos. *Journal of Zoology*, 303(1), 46-53.
- Dayananda, B., & Webb, J. K. (2017). Incubation under climate warming affects learning ability and survival in hatchling lizards. *Biology letters*, 13(3), 20170002.
- Deaner, R. O., Isler, K., Burkart, J., & Van Schaik, C. (2007). Overall brain size, and not encephalization quotient, best predicts cognitive ability across non-human primates. *Brain, behavior and evolution*, 70(2), 115-124.

- Demuth, J. P. (2001). The effects of constant and fluctuating incubation temperatures on sex determination, growth, and performance in the tortoise *Gopherus polyphemus*. *Canadian Journal of Zoology*, 79(9), 1609-1620.
- DeRosa, C. T., & Taylor, D. H. (1978). Sun-compass orientation in the painted turtle, *Chrysemys picta* (Reptilia, Testudines, Testudinidae). *Journal of Herpetology*, 25-28.
- Dias, B. G., Ataya, R. S., Rushworth, D., Zhao, J., & Crews, D. (2007). Effect of incubation temperature and androgens on dopaminergic activity in the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *Developmental Neurobiology*, 67(5), 630-636.
- Dicke, U., & Roth, G. (2016). Neuronal factors determining high intelligence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1685), 20150180.
- Downes, S. J., & Shine, R. (1999). Do incubation-induced changes in a lizard's phenotype influence its vulnerability to predators?. *Oecologia*, 120(1), 9-18.
- Du, W. G., Shou, L., & Liu, J. K. (2003). The effect of incubation temperature on egg survival, hatchling traits and embryonic use of energy in the blue-tailed skink, *Eumeces elegans*. *Animal biology*, 53(1), 27-36.
- Eiby, Y. A., & Booth, D. T. (2011). Determining optimal incubation temperature for a head-start program: the effect of incubation temperature on hatchling Burnett River snapping turtles (*Elseya albagula*). *Australian Journal of Zoology*, 59(1), 18-25.
- Elphick, M. J., & Shine, R. (1998). Longterm effects of incubation temperatures on the morphology and locomotor performance of hatchling lizards (*Bassiana duperreyi*, Scincidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 63(3), 429-447.
- Emer, S. A., Mora, C. V., Harvey, M. T., & Grace, M. S. (2015). Predators in training: operant conditioning of novel behavior in wild Burmese pythons (*Python molurus bivittatus*). *Animal cognition*, 18(1), 269-278.
- Feiner, N., Rago, A., While, G. M., & Uller, T. (2018). Developmental plasticity in reptiles: Insights from temperature-dependent gene expression in wall lizard embryos. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 329(6-7), 351-361.
- Ferguson, M. W., & Deeming, D. C. (Eds.). (1991). *Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles*. Cambridge University Press.

Font E. (2020) Squamate Cognition. In: Vonk J., Shackelford T. (eds) Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior. Springer, Cham

Gaalema, D. E. (2011). Visual discrimination and reversal learning in rough-necked monitor lizards (*Varanus rudicollis*). *Journal of Comparative Psychology*, 125(2), 246.

Golinski, A., Kubička, L., John-Alder, H., & Kratochvíl, L. (2014). Elevated testosterone is required for male copulatory behavior and aggression in Madagascar ground gecko (*Paroedura picta*). *General and comparative endocrinology*, 205, 133-141.

Gutnick, T., Weissenbacher, A., & Kuba, M. J. (2020). The underestimated giants: operant conditioning, visual discrimination and long-term memory in giant tortoises. *Animal Cognition*, 23(1), 159-167.

Güntürkün, O., Ströckens, F., Scarf, D., & Colombo, M. (2017). Apes, feathered apes, and pigeons: differences and similarities. *Current opinion in behavioral sciences*, 16, 35-40.

Healy, S. D., & Rowe, C. (2007). A critique of comparative studies of brain size. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1609), 453-464.

Herculano-Houzel, S. (2017). Numbers of neurons as biological correlates of cognitive capability. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 16, 1-7.

Herculano-Houzel, S., & Lent, R. (2005). Isotropic fractionator: a simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain. *Journal of Neuroscience*, 25(10), 2518-2521.

Herculano-Houzel, S., Mota, B., & Lent, R. (2006). Cellular scaling rules for rodent brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(32), 12138-12143.

Herculano-Houzel, S., Catania, K., Manger, P. R., & Kaas, J. H. (2015). Mammalian brains are made of these: a dataset of the numbers and densities of neuronal and nonneuronal cells in the brain of glires, primates, scandentia, eulipotyphlans, afrotherians and artiodactyls, and their relationship with body mass. *Brain, Behavior and Evolution*, 86(3-4), 145-163.

Herculano-Houzel, S., Collins, C. E., Wong, P., & Kaas, J. H. (2007). Cellular scaling rules for primate brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(9), 3562-3567.

Herculano-Houzel, S., Messeder, D. J., Fonseca-Azevedo, K., & Pantoja, N. A. (2015). When larger brains do not have more neurons: increased numbers of cells are compensated by decreased average cell size across mouse individuals. *Frontiers in neuroanatomy*, 9, 64.

- Horschler, D. J., Hare, B., Call, J., Kaminski, J., Miklósi, Á., & MacLean, E. L. (2019). Absolute brain size predicts dog breed differences in executive function. *Animal cognition*, 22(2), 187-198.
- Jerison, H. J. (1973). *Evolution of the brain and intelligence* Academic Press
- Kis, A., Huber, L., & Wilkinson, A. (2015). Social learning by imitation in a reptile (*Pogona vitticeps*). *Animal cognition*, 18(1), 325-331.
- Koolhaas, J. M., Korte, S. M., De Boer, S. F., Van Der Vegt, B. J., Van Reenen, C. G., Hopster, H., ... & Blokhuis, H. J. (1999). Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 23(7), 925-935.
- Kotrschal, A., Corral-Lopez, A., Amcoff, M., & Kolm, N. (2015). A larger brain confers a benefit in a spatial mate search learning task in male guppies. *Behavioral Ecology*, 26(2), 527-532.
- Kotrschal, A., Lievens, E. J., Dahlbom, J., Bundsen, A., Semenova, S., Sundvik, M., ... & Kolm, N. (2014). Artificial selection on relative brain size reveals a positive genetic correlation between brain size and proactive personality in the guppy. *Evolution*, 68(4), 1139-1149.
- Kratochvíl, L., Kubička, L., Vohralík, M., & Starostová, Z. (2018). Variability in vertebral numbers does not contribute to sexual size dimorphism, interspecific variability, or phenotypic plasticity in body size in geckos (Squamata: Gekkota: Paroedura). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 329(4-5), 185-190.
- Kubička, L., Starostova, Z., & Kratochvíl, L. (2012). Temperature-dependent rate of clutch production in a tropical lizard (*Paroedura picta*: Gekkonidae): intraspecific test of the metabolic theory of ecology. *Journal of Thermal Biology*, 37(3), 179-184.
- Kubička, L., Starostová, Z., & Kratochvíl, L. (2015). Endogenous control of sexual size dimorphism: Gonadal androgens have neither direct nor indirect effect on male growth in a Madagascar ground gecko (*Paroedura picta*). *General and comparative endocrinology*, 224, 273-277.
- Kverková, K., Polonyiová, A., Kubička, L., Němec, P.: Individual and age-related variation of cellular brain composition in a squamate reptile, *Biology Letters* – v recenzním řízení
- Leal, M., & Powell, B. J. (2012). On the flexibility of lizards' cognition: a response to Vasconcelos et al. *Biology letters*, 8(1), 44-45.

- Lohmann, K. J., & Lohmann, C. M. F. (1993). A light-independent magnetic compass in the leatherback sea turtle. *The Biological Bulletin*, 185(1), 149-151.
- Lohmann, K. J., Putman, N. F., & Lohmann, C. M. (2012). The magnetic map of hatchling loggerhead sea turtles. *Current opinion in neurobiology*, 22(2), 336-342.
- López, J. C., Rodríguez, F., Gómez, Y., Vargas, J. P., Broglio, C., & Salas, C. (2000). Place and cue learning in turtles. *Animal Learning & Behavior*, 28(4), 360-372.
- López, P., Hawlena, D., Polo, V., Amo, L., & Martín, J. (2005). Sources of individual shy–bold variations in antipredator behaviour of male Iberian rock lizards. *Animal Behaviour*, 69(1), 1-9.
- MacLean, E. L., Hare, B., Nunn, C. L., Addessi, E., Amici, F., Anderson, R. C., ... & Boogert, N. J. (2014). The evolution of self-control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(20), E2140-E2148.
- Marhounová, L., Kotrschal, A., Kverková, K., Kolm, N., & Němec, P. (2019). Artificial selection on brain size leads to matching changes in overall number of neurons. *Evolution*, 73(9), 2003-2012.
- McEvoy, J., While, G. M., Sinn, D. L., Carver, S., & Wapstra, E. (2015). Behavioural syndromes and structural and temporal consistency of behavioural traits in a social lizard. *Journal of Zoology*, 296(1), 58-66.
- Mell, H., Josserand, R., Decencièrre, B., Artacho, P., Meylan, S., & Le Galliard, J. F. (2016). Do personalities co-vary with metabolic expenditure and glucocorticoid stress response in adult lizards?. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 70(6), 951-961.
- Meter, B., Starostová, Z., Kubicka, L., & Kratochvil, L. (2020). The limits of the energetical perspective: life-history decisions in lizard growth. *EVOLUTIONARY ECOLOGY*.
- Michelangeli, M., Chapple, D. G., Goulet, C. T., Bertram, M. G., & Wong, B. B. (2019). Behavioral syndromes vary among geographically distinct populations in a reptile. *Behavioral Ecology*, 30(2), 393-401.
- Mullen, R. J., Buck, C. R., & Smith, A. M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 116(1), 201-211.
- Murphy, P. A. (1981). Celestial compass orientation in juvenile American alligators (*Alligator mississippiensis*). *Copeia*, 638-645.

- Nelson, N. J., Thompson, M. B., Pledger, S., Keall, S. N., & Daugherty, C. H. (2004). Egg mass determines hatchling size, and incubation temperature influences post-hatching growth, of tuatara *Sphenodon punctatus*. *Journal of Zoology*, 263(1), 77-87.
- Němec, P., & Osten, P. (2020). The evolution of brain structure captured in stereotyped cell count and cell type distributions. *Current Opinion in Neurobiology*, 60, 176-183.
- Neves, K., Guercio, G. D., Anjos-Travassos, Y., Costa, S., Perozzo, A., Montezuma, K., Herculano-Houzel, S., Panizzutti, R. (2020). Lack of correlation between number of neurons and behavioral performance in Swiss mice. *Neuroscience Letters*, 135202
- Ngwenya, A., Patzke, N., Manger, P. R., & Herculano-Houzel, S. (2016). Continued growth of the central nervous system without mandatory addition of neurons in the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*). *Brain, Behavior and Evolution*, 87(1), 19-38.
- Noro, M., Uejima, A., Abe, G., Manabe, M., & Tamura, K. (2009). Normal developmental stages of the Madagascar ground gecko *Paroedura pictus* with special reference to limb morphogenesis. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 238(1), 100-109.
- Olkowicz, S., Kocourek, M., Lučan, R. K., Porteš, M., Fitch, W. T., Herculano-Houzel, S., & Němec, P. (2016). Birds have primate-like numbers of neurons in the forebrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(26), 7255-7260.
- Pallotta, M. M., Turano, M., Ronca, R., Mezzasalma, M., Petraccioli, A., Odierna, G., & Capriglione, T. (2017). Brain gene expression is influenced by incubation temperature during leopard gecko (*Eublepharis macularius*) development. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 328(4), 360-370.
- Paredes, U., Radersma, R., Cannell, N., While, G. M., & Uller, T. (2016). Low incubation temperature induces DNA hypomethylation in lizard brains. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 325(6), 390-395.
- Paulissen, M. A. (2008). Spatial learning in the little brown skink, *Scincella lateralis*: the importance of experience. *Animal Behaviour*, 76(1), 135-141.
- Pieau, C., Dorizzi, M., & Richard-Mercier, N. (1999). Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 55(6-7), 887-900.

Qualls, C. P., & Andrews, R. M. (1999). Cold climates and the evolution of viviparity in reptiles: cold incubation temperatures produce poor-quality offspring in the lizard, *Sceloporus virgatus*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 67(3), 353-376.

R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

Réale, D., Reader, S. M., Sol, D., McDougall, P. T., & Dingemanse, N. J. (2007). Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biological reviews*, 82(2), 291-318.

Sakata, J. T., Coomber, P., Gonzalez-Lima, F., & Crews, D. (2000). Functional connectivity among limbic brain areas: differential effects of incubation temperature and gonadal sex in the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *Brain, Behavior and Evolution*, 55(3), 139-151.

Sakata, J. T., & Crews, D. (2003). Embryonic temperature shapes behavioural change following social experience in male leopard geckos, *Eublepharis macularius*. *Animal Behaviour*, 66(5), 839-846.

Shanbhag, B., Ammann, V., & Saidapur, S. (2010). Associative learning in hatchlings of the lizard *Calotes versicolor*: taste and colour discrimination. *Amphibia-Reptilia*, 31(4), 475-481.

Shen, W., Pei, J. C., Lin, L. H., & Ji, X. (2017). Effects of constant versus fluctuating incubation temperatures on hatching success, incubation length and hatchling morphology in the Chinese skink (*Plestiodon chinensis*). *Asian Herpetol Res*, 8, 262-268.

Shine, R., & Elphick, M. J. (2001). The effect of short-term weather fluctuations on temperatures inside lizard nests, and on the phenotypic traits of hatchling lizards. *Biological Journal of the Linnean Society*, 72(4), 555-565.

Siviter, H., Deeming, D. C., Rosenberger, J., Burman, O. H., Moszuti, S. A., & Wilkinson, A. (2017b). The impact of egg incubation temperature on the personality of oviparous reptiles. *Animal cognition*, 20(1), 109-116.

Siviter, H., Deeming, D. C., van Giezen, M. F. T., & Wilkinson, A. (2017a). Incubation environment impacts the social cognition of adult lizards. *Royal Society open science*, 4(11), 170742.

Siviter, H., Deeming, D. C., & Wilkinson, A. (2019). Egg incubation temperature influences the growth and foraging behaviour of juvenile lizards. *Behavioural processes*, 165, 9-13.

- Starostová, Z., Kubička, L., & Kratochvíl, L. (2010). Macroevolutionary pattern of sexual size dimorphism in geckos corresponds to intraspecific temperature-induced variation. *Journal of evolutionary biology*, 23(4), 670-677.
- Starostová, Z., Gvoždík, L., & Kratochvíl, L. (2017). An energetic perspective on tissue regeneration: The costs of tail autotomy in growing geckos. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 206, 82-86.
- Starostová, Z., Kubička, L., Golinski, A., & Kratochvíl, L. (2013). Neither male gonadal androgens nor female reproductive costs drive development of sexual size dimorphism in lizards. *Journal of experimental biology*, 216(10), 1872-1880.
- Stöwe, M., Rosivall, B., Drent, P. J., & Möstl, E. (2010). Selection for fast and slow exploration affects baseline and stress-induced corticosterone excretion in Great tit nestlings, *Parus major*. *Hormones and behavior*, 58(5), 864-871.
- Sun, B. J., Li, T., Gao, J., Ma, L., & Du, W. G. (2015). High incubation temperatures enhance mitochondrial energy metabolism in reptile embryos. *Scientific Reports*, 5, 8861.
- Teyssier, A., Bestion, E., Richard, M., & Cote, J. (2014). Partners' personality types and mate preferences: predation risk matters. *Behavioral Ecology*, 25(4), 723-733.
- Trník, M., Albrechtová, J., & Kratochvíl, L. (2011). Persistent effect of incubation temperature on stress-induced behavior in the Yucatan banded gecko (*Coleonyx elegans*). *Journal of Comparative Psychology*, 125(1), 22.
- Warner, D. A., Woo, K. L., Van Dyk, D. A., Evans, C. S., & Shine, R. (2010). Egg incubation temperature affects male reproductive success but not display behaviors in lizards. *Behavioral ecology and sociobiology*, 64(5), 803-813.
- Waters, R. M., Bowers, B. B., & Burghardt, G. M. (2017). Personality and individuality in reptile behavior. In *Personality in nonhuman animals* (pp. 153-184). Springer, Cham.
- Webb, J. K., Brown, G. P., & Shine, R. (2001). Body size, locomotor speed and antipredator behaviour in a tropical snake (*Tropidonophis mairii*, Colubridae): the influence of incubation environments and genetic factors. *Functional Ecology*, 15(5), 561-568.
- Weiser, H., Starostová, Z., Kubička, L., & Kratochvíl, L. (2012). Overlap of female reproductive cycles explains shortened interclutch interval in a lizard with invariant clutch size (Squamata: Gekkonidae: *Paroedura picta*). *Physiological and Biochemical Zoology*, 85(5), 491-498.

- While, G. M., Noble, D. W., Uller, T., Warner, D. A., Riley, J. L., Du, W. G., & Schwanz, L. E. (2018). Patterns of developmental plasticity in response to incubation temperature in reptiles. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 329(4-5), 162-176.
- Wilkinson, A., Chan, H. M., & Hall, G. (2007). Spatial learning and memory in the tortoise (*Geochelone carbonaria*). *Journal of Comparative Psychology*, 121(4), 412.
- Wilkinson, A., Kuenstner, K., Mueller, J., & Huber, L. (2010b). Social learning in a non-social reptile (*Geochelone carbonaria*). *Biology letters*, 6(5), 614-616.
- Wilkinson, A., Mandl, I., Bugnyar, T., & Huber, L. (2010a). Gaze following in the red-footed tortoise (*Geochelone carbonaria*). *Animal cognition*, 13(5), 765-769.
- Wilson, V., Guenther, A., Øverli, Ø., Seltmann, M. W., & Altschul, D. (2019). Future directions for personality research: contributing new insights to the understanding of animal behavior. *Animals*, 9(5), 240.
- Young, M., Salmon, M., & Forward, R. (2012). Visual wavelength discrimination by the loggerhead turtle, *Caretta caretta*. *The Biological Bulletin*, 222(1), 46-55.
- Zahradnick, O., Horacek, I., & Tucker, A. S. (2012). Tooth development in a model reptile: functional and null generation teeth in the gecko *Paroedura picta*. *Journal of anatomy*, 221(3), 195-208.